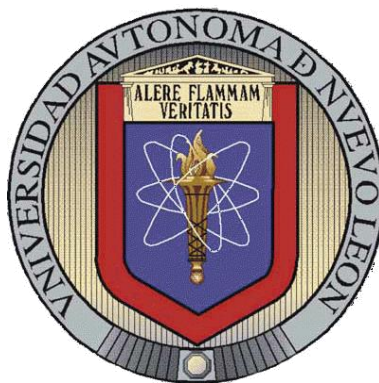


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Candida* y *Aspergillus*
MEDIANTE LA APLICACIÓN
DE LA PCR/RFLP**

Por

GERARDO RAMOS ALFANO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología**

Mayo de 2014

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Candida* y *Aspergillus*
MEDIANTE LA APLICACIÓN
DE LA PCR/RFLP**

Comité de Tesis

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Directora

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Dra. Gloria María González González
Vocal

Dr. Javier Ramos Jiménez
Vocal

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado de manera completa y exclusiva a **Dios, nuestro Señor**, por:

- *Encomendarme con mis padres, Héctor Arnoldo y Aída, quienes me siguen educando, cuidando, apoyando y amando;*
- *regalarme una verdadera familia, mis padres y mis hermanos, Héctor Arnoldo, Aída Itzamara y Mayela del Jesús;*
- *mis sobrinos, mi cuñada y cuñados;*
- *mis queridos Tutores, Juan Manuel y Lydia, quienes de manera muy caritativa y desinteresada me han integrado a su familia;*
- *mis amigos del Laboratorio de Micología y Fitopatología, por su cariño y apoyo desde hace más de siete años;*
- *mis amigos del Laboratorio de Inmunología y Virología durante nueve años;*
- *mis amigos del Departamento de Ciencias Exactas y Humanidades por doce años ininterrumpidos de cariño;*
- *mis amigos de la Dirección de Vinculación y Servicio Social de la UANL, por todo su apoyo y ayuda,*
- *mis amigas de la oficina del Señor Rector y la Secretaría Técnica de la UANL quienes siempre me han demostrado su cariño y apoyo a pesar de su arduo trabajo,*
- *mis amigos Presbíteros, ejemplo del testimonio de Dios entre nosotros, por sus consejos, su comprensión y guía, Pbro y Ph.D. Pablo César Mejía Vara, Pbro. Alfonso Rogelio Villarreal Álvarez, Pbro. Carlos Treviño Hernández y Pbro y Lic. Osbaldo Rentería Hinojosa*
- *mis hermanos del Movimiento Cursillos de Cristiandad;*
- *mis hermanos del Seminario Arquidiocesano de Monterrey. Seminaristas y Padres Formadores.*

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo general	3
3.2 Objetivos particulares	3
4. ANTECEDENTES	4
4.1 Micosis	4
4.1.1 Micosis en pacientes inmunocomprometidos	4
4.2 Candidiasis	6
4.2.1 Aspectos epidemiológicos	6
4.2.2 Estrategia fúngica invasiva	8
4.2.3 Manifestaciones clínicas	9
4.2.3.1 Infecciones de las mucosas	9
4.2.3.2 Infecciones de órganos profundos	10
4.2.4 Situaciones especiales	12
4.2.4.1 Niños	12
4.2.4.2 Embarazo	12
4.2.5 Problemas con el diagnóstico convencional	13
4.2.6 Detección molecular de <i>Candida spp.</i>	15
4.2.6.1 Diagnóstico molecular con PCR	15
4.2.6.2 Análisis genético de <i>Candida</i> en base a secuencias intergénicas ribosomales	15
4.2.6.3 Uso de los oligonucleótidos ITS3 e ITS4	17

4.3	Aspergilosis	18
4.3.1	Etiología	18
4.3.2	Manifestaciones clínicas	19
4.3.2.1	Aspergilosis alérgica	20
4.3.2.2	Aspergiloma	20
4.3.2.3	Aspergilosis pulmonar invasiva	21
4.3.2.4	Aspergilosis necrotizante crónica del pulmón o forma semiinvasiva	21
4.3.2.5	Aspergilosis invasiva aguda del pulmón	22
4.3.2.6	Aspergilosis extrapulmonar, traqueobronquitis y aspergilosis bronquial obstructiva	22
4.3.2.7	Sinusitis	22
4.3.2.8	Aspergilosis en SIDA	23
4.3.2.9	Aspergilosis en transplantados	24
4.3.2.10	Aspergilosis en neonatos	27
4.3.2.11	Aspergilosis en cáncer	28
4.3.3	Tratamiento	29
4.3.4	Diagnóstico	29
4.3.5.	Diagnóstico de infecciones fúngicas	30
4.3.6.	Diagnóstico microbiológico de aspergilosis	31
4.3.7.	Diagnóstico molecular de aspergilosis	33
4.3.7.1	Secuencias intergénicas de los genes ribosomales de <i>Aspergillus</i>	33
4.3.7.2	Estrategias de amplificación por PCR: aplicaciones específicas	35
5.	MÉTODOS	38
5.1	Cultivos de colección	38
5.2	Preparación de los cultivos y extracción del ADN	38
5.2.1	Método de extracción de ADN por Sambrook y Russell, 2001 para levaduras	38
5.2.2	Método de extracción de ADN según Jin <i>et al.</i> , (2004) para hongos filamentosos	39
5.3	Selección de oligonucleótidos y condiciones de PCR.	40
5.4	Secuenciación y análisis de las regiones ITS2-5.8S ARNr	40
5.5	Obtención <i>in silico</i> de secuencia consenso de <i>C. glabrata</i> y <i>A. fumigatus</i>	41
5.6	Selección de sitios de corte por endonucleasas de restricción	41

5.7	RFLP	41
5.8	Electroforesis en gel de poliacrilamida	42
5.9	PCR/RFLP en aislados clínicos.	42
5.10	Especificidad de la prueba con DNA no fúngico	43
6.	RESULTADOS	44
6.1	Secuencias in silico de <i>C. glabrata</i> y <i>A. fumigatus</i>	44
6.2	Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr	44
6.3	Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de <i>Candida</i> spp y <i>Aspergillus</i> spp.	49
6.4	Análisis por PCR/RFLP en aislados clínicos.	53
6.5	Comparación del método tradicional contra PCR/RFLP de ITS2-5.8s ARNr	57
6.6	Análisis en aislados clínicos bacteriológicos y humano	58
7.	DISCUSIÓN	59
8.	CONCLUSIONES	62
	APÉNDICE	63
	LITERATURA CITADA	74
	RESÚMEN BIOGRÁFICO	83

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra, por permitirme colaborar en su equipo de trabajo, en especial para el desarrollo de este proyecto de investigación, así como durante todos mis estudios de postgrado.

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, por la Dirección principal y asesoría de un servidor, por enseñarme a ser perseverante, paciente, tenaz y comprensivo, sin lo cual, no se habrían alcanzado las metas académicas, tanto teóricas como prácticas, del grado de estudios por sustentar.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez, Jefe del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de esta Institución, por su apoyo con la infraestructura, reactivos y recursos humanos del laboratorio que él dirige; asimismo, sus consejos, asesoría y planeación para el correcto desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Gloria Ma. González González y a la M.C. Lidia Oviedo del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Medicina de la UANL; a la Dra. González por su asesoría y revisión de los fundamentos teóricos y prácticos así como los logros obtenidos del proyecto. A la M.C. Oviedo por su apoyo práctico durante el mismo.

Al M.C. Carlos Aguirre Martínez, Q.B.P. Rosa del Carmen Pacheco García y Dr. José Manuel Vázquez Guillén, por su apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Elva T. Aréchiga, al M.C. Carlos Aguirre Martínez, M.C. Efrén Ricardo Robledo Leal y al Q.B.P. José Manuel Vázquez Guillén por su colaboración en la revisión, edición de escritura y de imágenes de esta tesis.

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Cepas de colección utilizadas en el presente estudio. Se incluye el número de acceso al GenBank, el tamaño de la región ITS2, 5.8S y parcial 28S del gen ARNr, las enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos por corte con ellas	47
II	Comparación del método de identificación convencional de <i>Candida spp.</i> y <i>Aspergillus spp.</i> con la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía en microscopio compuesto 40X de <i>Candida albicans</i>	7
2	Imagen mostrando un paciente con algodoncillo o muget provocada por <i>C. albicans</i>	10
3	Candidiasis esofágica	11
4	Candidiasis congénita en un neonato	13
5	Representación esquemática de la distribución de los genes ribosomales en hongos	18
6	Fotografía en microscopio electrónico de barrido de <i>A. fumigatus</i>	19
7	Aspergiloma (Tomada de Dr. José Uberos Fernández)	21
8	Construcción de secuencia consenso de <i>C. glabrata</i> a partir de secuencias previamente reportadas en el GenBank-NCBI, USA	45
9	Construcción de secuencia consenso de <i>A. fumigatus</i> a partir de secuencias previamente reportadas en el GenBank-NCBI, USA	46
10	Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr. Amplificación por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0% de especies de colección del género <i>Candida</i>	48
11	Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr. Amplificación por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0% de especies de colección del género <i>Aspergillus</i>	49
12	Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de <i>Candida spp.</i> . Esquematización del análisis <i>in silico</i> de los polimorfismos de restricción para las especies del género <i>Candida</i>	50
13	Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de <i>Aspergillus spp.</i> . Esquematización del análisis <i>in silico</i> de los polimorfismos de restricción para las especies del género <i>Aspergillus</i>	51

14	Caracterización por PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S del ARN ribosomal de especies de importancia clínica del género <i>Candida</i>	51
15	Caracterización por PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S del ARN ribosomal de especies de importancia clínica del género <i>Aspergillus</i>	53
16	Caracterización por PCR/RFLP de 23 aislados clínicos de <i>C. albicans</i> de la región ITS2-5.8S ARNr	54
17	Caracterización por PCR/RFLP de 13 aislados clínicos de <i>C. tropicalis</i> de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE al 8.0%	55
18	Caracterización de 24 aislados clínicos de <i>C. parapsiiosis</i> identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr. En PAGE al 8.0%	55
19	Caracterización de 7 aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0%	56
20	Caracterización de 4 aislados clínicos de <i>Aspergillus</i> identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0%. a) <i>A. flavus</i> , b) <i>A. terreus</i> y c) <i>A. fumigatus</i>	57

RESUMEN

Los avances actuales en el manejo y tratamiento de los pacientes inmunocomprometidos han contribuido a incrementar la incidencia de infecciones invasivas causadas por hongos tanto patógenos como oportunistas. La mayoría de estas micosis son atribuidas a especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus*. Asimismo, se ha observado que la rápida identificación del agente etiológico es necesaria para el manejo correcto del paciente, así como la administración de la terapia antifúngica apropiada para reducir la mortalidad en este tipo de pacientes donde puede ser de hasta un 40%. En el presente estudio se utilizó el método PCR/RFLP en los polimorfismos de espacios internos transcritos 2 (ITS2) de los genes ribosomales para identificar y diferenciar entre trece especies de importancia clínica, siete de *Candida spp.* y seis de *Aspergillus spp.* Para su validación, se aplicó el método propuesto a 71 aislados clínicos previamente identificados por métodos microbiológicos, 67 provenientes de pacientes con candidiasis sistémica y cuatro con aspergilosis pulmonar. El análisis por PCR se llevó a cabo a partir de ADN genómico con oligonucleótidos específicos para amplificar la región ITS2-5.8S del ARN ribosomal. Las amplificaciones por PCR fueron caracterizadas por análisis de los fragmentos con enzimas de restricción previamente determinadas para diferenciar entre las cepas de referencia. Cuando se aplicó este método a los 71 aislados clínicos de pacientes se determinó que: 23 correspondían a *C. albicans*, 13 a *C. tropicalis*, 24 a *C. parapsilosis*, 7 a *C. glabrata*, 2 de *A. flavus*, 1 *A. terreus* y 1 *A. fumigatus*. Por lo anterior se determinó que la PCR combinada con la RFLP es un método rápido, sensible y útil para determinar el agente etiológico en una infección fúngica.

ABSTRACT

Recently, advances in the management and treatment of immunocompromised patients have contributed to an increased incidence of invasive infections caused by primary and opportunistic fungal pathogens. Most of these life-threatening infections are still attributable to *Candida* and *Aspergillus* species. Rapid identification of the etiologic agent is a prerequisite for the correct onset of an appropriate antifungal therapy to reduce the mortality that in this kind of patients can be at least of 40%. In this study we evaluated a combined PCR/RFLP strategy based on internal transcribed spacer 2 region polymorphisms (ITS2) to identify and differentiate between different *Candida* and *Aspergillus* species. 67 Yeasts isolates from systemic candidiasis patients and four molds from pulmonary aspergillosis patients were previously identified by conventional culture and microbiological methods. PCR analysis was performed from genomic DNA with a primer pair targeted to the ITS2-5.8S rRNA region. The PCR positive samples were specie-specific characterized by restriction fragment analysis with enzymes previously proved to differentiate between eleven reference strains of *Candida* and *Aspergillus* species. A PCR/RFLP combined strategy was successful to identify among six *Candida* and five different *Aspergillus* species using reference strains. When this method was applied to 71 clinical isolates from patients with fungal infections we were able to identify that 23 of them were infected with *C. albicans*, 13 *C. tropicalis*, 24 *C. parapsilosis*, 7 *C. glabrata*, 2 *A. flavus*, 1 *A. terreus* and 1 *A. fumigatus*. PCR is a rapid sensitive and useful method to probe fungal etiology in fungal infections and combined with RFLP can identify with high precision the causal specie in the clinical isolate.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el caso de micosis sistémicas ha aumentado en morbilidad y mortalidad, tanto por resistencia a los antimicóticos por su uso indiscriminado así como por emergencia de patógenos antes poco convencionales.

Los principales grupos que se ven afectados por micosis sistémicas son aquellos que su estado inmune se encuentra comprometido, sin embargo se reconocen cuatro principalmente, y son: pacientes con VIH/SIDA, oncológicos, transplantados y neonatos.

En la actualidad, los métodos empleados para la detección e identificación de organismos involucrados en micosis sistémicas requieren de un periodo de tiempo largo de cinco días, lo cual causa el retraso en la decisión del experto para aplicar un tratamiento efectivo al paciente. Por otra parte, los sistemas de detección inmediata de levaduras en muestras solo detectan la presencia o ausencia del organismo.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo llegar a un diagnóstico temprano a través de la identificación de especies del género *Candida spp* y *Aspergillus spp* en aislados de muestras clínicas de pacientes con micosis mediante el uso de PCR/RFLP, esto redundará en la selección de antifúngicos efectivos para el tratamiento a tiempo de los pacientes inmunocomprometidos.

2. HIPÓTESIS

Es factible realizar una identificación molecular de las especies de *Candida* y *Aspergillus* en muestras clínicas de pacientes inmunocomprometidos utilizando los polimorfismos longitudinales de fragmentos de restricción en amplificados de la región ITS2-5.8S ARN ribosomal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar las especies del género *Candida* y *Aspergillus* en aislados clínicos de pacientes inmunocomprometidos por PCR/RFLP.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Analizar y caracterizar las secuencias ITS2-5.8S ARN ribosomal de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*

3.2.2 Estandarizar la técnica de PCR/RFLP para diferenciar las especies de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* de importancia clínica.

3.2.3 Identificar en aislados clínicos de pacientes con compromiso inmunológico las especies de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* mediante PCR/RFLP.

3.2.4 Comparar los resultados obtenidos con los presentados en la práctica clínica convencional

4. ANTECEDENTES

4.1 Micosis

La existencia de los hongos se remonta a más de 300 millones de años, existen cerca de dos millones de especies y 100,000 variedades. Son organismos de vida libre y no dependen para su subsistencia de plantas, animales o del humano, por lo tanto su patogenicidad está bien delimitada.

Aproximadamente son 200 las especies de hongos asociadas a enfermedades humanas, siendo un pequeño número de casos los que causan enfermedades graves significativas, sin embargo, durante las últimas dos décadas del siglo pasado se observó una emergencia de casos clínicos de micosis consideradas raras incrementando la morbilidad y mortalidad así como la aparición de cepas resistentes a los fármacos. Se cree que las causas de emergencia de infecciones podrían estar relacionadas por un lado, por la migración al encontrarse bien determinadas las regiones endémicas del patógeno, por otro lado al clima y por último a la aparición de infecciones por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Van den Saffele y Boelaert, 1995).

Los factores necesarios para la aparición de una micosis invasiva en general se consideran la exposición al hongo, la adquisición del huésped de un patógeno potencial, competencia del patógeno con la flora microbiana, fallas en las barreras físicas que proporcionan inmunidad o desarrollo del patógeno muy por encima de las defensas del huésped (Coleman *et al.*, 1998).

4.1.1 Micosis en pacientes inmunocomprometidos

La emergencia de infecciones micóticas oportunistas se encuentra ligada al incremento de pacientes inmunocomprometidos, ya que un hongo inocuo, o no virulento puede convertirse en patógeno en esta clase de pacientes. La inmunodeficiencia puede ser ocasionada por varias causas: a) puede ser inducida por fármacos como es la administración de quimioterapia, de esteroides o agentes inmunosupresores en pacientes

con Cáncer o enfermedades autoinmunes; b) por inmunodeficiencias congénitas como es la enfermedad granulomatosa crónica, inmunodeficiencia combinada severa, c) por desordenes mieloproliferativos, d) por una hipogamaglobulinemia transitoria del lactante, e) por inmunodeficiencias adquiridas como la causada por el VIH, f) otro tipo de infecciones virales como la ocasionada por el citomegalovirus y por otras causas relacionadas a desnutrición, la edad como neonatos y adultos mayores (Fridkin y Jarvis, 1996).

El concepto de inmunosupresión, al menos de manera superficial, puede ser definido como la facilidad o la predisposición de adquirir infecciones que habitualmente no se presentarían en personas con un sistema inmunológico competente (García-Ruiz, 2004).

Las causas de falla en la defensa del hospedero de las enfermedades fúngicas es principalmente por daños o disfuncionalidad en los órganos tales como, cirugías o daños en tegumento, introducción de catéteres o dispositivos intravenosos, quemaduras, úlceras en tracto digestivo, disminución de secreción de moco por tejido ciliado, diabetes, falla en riñón, hígado o pulmones y administración de antibióticos (Rüchel, 1996). Asimismo, el Centro Nacional de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) evaluó las infecciones nosocomiales estimando que afectaron 2 millones de pacientes por año produciendo un gasto de 450 millones de dólares extra al padecimiento original, en la mayoría de los casos prevalecieron las especies de *Candida*.

Los hongos que son considerados patógenos nosocomiales clásicos son especies del género *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Zygomycetes*; los patógenos emergentes son especies del género *Fusarium* y *Trichosporum beigelii*. (Fridkin y Jarvis, 1996).

Diferentes factores físicos y biológicos causan las infecciones nosocomiales, entre ellos la carencia de aire filtrado, los sistemas de ventilación, el polvo, agua, algunos alimentos funcionan como reservorios de hongos para *Aspergillus* y *Zygomycetes*. Los reservorios para especies de *Candida* son intrínsecos, por ser un organismo comensal, o puede ser a través de infecciones cruzadas por trabajadores de la salud. (Fridkin y Jarvis, 1996)

En pacientes con cáncer, se observa una alta incidencia de micosis nosocomiales por inmunosupresión producida por quimioterapia, radioterapia, corticoesteroides

desnutrición y ulceración de mucosa producida por quimioterapia; factores no relacionados a la inmunosupresión se consideran los antibióticos y cirugías (Rüchel, 1996). Las micosis oportunistas son favorecidas en un gran número por factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, nutrición parenteral así como drogadicción, neoplasias, SIDA, colagenopatías, neonatos prematuros y diabetes mellitus (Hernández-Hernández *et al.*, 2003).

Cada día es mayor el índice de infecciones en pacientes inmunocomprometidos, causadas por hongos de bajo potencial patógeno como *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Geotrichum* (Coleman *et al.*, 1998; Méndez-Tovar *et al.*, 1999). Las infecciones por hongos altamente virulentos como *Criptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides brasiliensis* también son causa de un número creciente de infecciones en este tipo de pacientes (Casanova y Ruiz, 1993).

El aislamiento de hongos, considerados no patógenos primarios, a partir de especímenes que contienen una flora diversa y abundante, representa un problema en la interpretación del papel patógeno, por lo que es necesario establecer y reunir ciertos parámetros para definir su participación en la enfermedad (Pfaller y Herwald, 1997; Esandi *et al.*, 1999).

4.2 Candidiasis

4.2.1 Aspectos epidemiológicos

Candida spp. son microorganismos comensales ubicuos del hombre y de muchos animales de sangre caliente que residen principalmente en el tracto gastrointestinal pero que también pueden estar presentes en uretra, vagina, piel, uñas o en el medio ambiente, ya que han sido identificados en suelo, aire y agua, tanto dulce como salada; en fomites como la ropa y objetos manipulados. *Candida* desarrolla patogenicidad utilizando una serie de factores de virulencia que la facultan para producir infecciones; de ellos varios han sido descritos, principalmente en *C. albicans*, entre los que puede destacarse la capacidad de cambiar morfológicamente bajo ciertas circunstancias de estrés facilitando

su adaptación a los microambientes donde se hospeda. Estos cambios llevan a la formación de estructuras tubulares, hifas o pseudomicelios, dotadas de una mayor capacidad adhesiva que facilitan la invasión. También, al menos *C. albicans*, tiene la capacidad de crecer y dividirse siguiendo las señales derivadas del contacto con la topografía del tejido huésped, éste movimiento es llamado tigmotrófico (García-Ruiz, 2004).

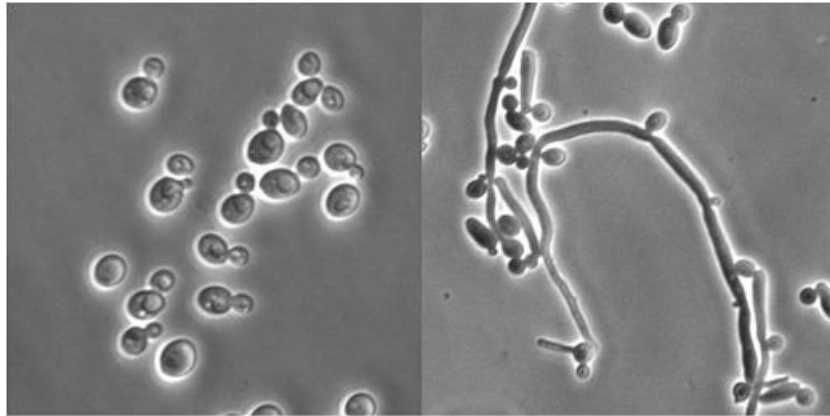


Figura 1. Fotografía en microscopio compuesto 40X de *Candida albicans*, en la imagen izquierda se observan células en gemación, y en la derecha formando un pseudomicelio.

La formación de hifas y el movimiento tigmotrófico probablemente sean los responsables de la traslocación sobre la mucosa del tracto gastrointestinal de *Candida*, con su ulterior acceso a la circulación sanguínea y consiguiente diseminación, fundamentalmente al hígado por la vía de circulación portal (García-Ruiz, 2004).

C. albicans es la levadura más común asociada con infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Fridkin y Jarvin, 1996; Pfaller, 1994; Vargas-Montiel *et al.*, 1999). Estudios realizados por Hernández-Hernández *et al.*, (2003) en un hospital en la Ciudad de México buscando la frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos encuentran que los aislados de *Candida* asociados a infección el 68.64% correspondían a *C. albicans*, resultando con grado significativo las *Candida* no *albicans* (31.4%), como *C. glabrata* y *C. krusei* que manifiestan resistencia a los azoles de uso común en terapia antimicótica. Asimismo, *C. albicans* aislada en 34.2% de los casos solo en la estación de

verano, ha sido implicada en infecciones respiratorias severas, del sistema nervioso central y en fungemias, principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

La principal fuente de infección en los humanos es la vía endógena; es comensal de la piel, del tubo digestivo, de las vías respiratorias superiores y del tracto genital femenino; la piel y las mucosas intactas son la primera barrera defensiva frente a su infección. También es posible la transmisión entre pacientes en ambientes hospitalarios (Odds, 1988). No obstante, han sido descritas infecciones invasoras de claro origen exógeno, casi siempre nosocomial, procedentes de la manipulación de catéteres, dispositivos intravasculares, etc. (García-Ruiz, 2004).

La importancia del sistema inmunitario, en especial la respuesta celular por linfocitos, condiciona en gran parte las infecciones oportunistas que ocasionan este grupo de hongos (Hernández-Hernández *et al.*, 2003).

4.2.2 Estrategia fúngica invasiva

Para cambiar de su forma saprofítica a patógena, *Candida* spp., ha desarrollado algunos caracteres fenotípicos que le permiten penetrar el organismo hospedero. La propensión de la célula fúngica para cambiar es muy grande y depende de lo que hay a su alrededor; esto ha sido demostrado con los cambios fenotípicos en las cepas de *C. albicans* asociadas a infecciones invasivas. Para que *Candida* spp. realice una patogenia exitosa necesita superar dos obstáculos principales: producción de sustancias de adhesión al hospedero y enzimas líticas. Para realizar la transición dimórfica de blastospora a estadio filamentoso, *C. albicans* incrementa sus propiedades de adhesividad y secreción de proteinasa (Senté, 1997).

Desde el punto de vista del huésped, junto con la integridad de las barreras superficiales, la protección de las mucosas está asegurada por la respuesta inmune celular de tipo Th1 que, a través de la producción de citocinas proinflamatorias, mejora la eficacia de los fagocitos específicamente células polimorfo-nucleares y macrófago (Senté, 1997).

Los neutrófilos son particularmente importantes ya que la proliferación de *Candida* spp. en los tejidos está principalmente asociada con la neutropenia. El reconocimiento de las células del huésped por la levadura patógena *Candida albicans* es

probablemente un paso esencial en la patogenia del desarrollo de la enfermedad (Senté, 1997).

La interacción de las manoproteínas de las blastosporas y de las hifas con los receptores de las células del huésped ha sido estudiada por varios grupos de investigación. *C. albicans* reconoce diversos tipos de células del huésped así como proteínas de la matriz extracelular. Esta observación no es inesperada, dado el número de zonas del cuerpo que pueden ser colonizadas e infectadas por esta levadura. De hecho, parece que *C. albicans* ha desarrollado varios sistemas de reconocimiento del huésped. Esta afirmación se hace considerando que el microorganismo utiliza otros procesos para infectar, como la morfogénesis, la variabilidad fenotípica y la producción de enzimas invasivas, como las proteasas aspárticas y las fosfolipasas. El reconocimiento de las células epiteliales se realiza a través de manoproteínas de superficie (adhesinas) que se unen a receptores que contienen carbohidratos. El microorganismo también se une a queratinocitos, células endoteliales y proteínas de la matriz, como fibronectina, laminina, colágeno y entactina y, por tanto, parece poseer una adhesina de superficie tipo integrina. En la mayoría de los casos, la adhesina para cada una de estas proteínas del huésped es una manoproteína (Sturtevant, 1997).

Cualquiera que sea el proceso patogénico, éste se debe fundamentalmente a las modificaciones asociadas con los avances médicos que hace a los pacientes más susceptibles (Sturtevant, 1997).

4.2.3 Manifestaciones clínicas

Las especies de *Candida* pueden ocasionar cualquier tipo de patología en el paciente inmunocomprometido, se suelen establecer dos grandes grupos de infecciones; las de las mucosas y las de los órganos profundos (Martínez, 1998).

4.2.3.1 Infecciones de las mucosas

Incluyen aftas, esofagitis y vaginitis entre las principales; pero también tienen entidad propia la afectación de la mucosa del tubo digestivo no esofágica, balanitis, candidiasis cutánea, foliculitis, intertrigo, onicomicosis y la candidiasis perianal (Martínez, 1998).



Figura 2. Imagen mostrando un paciente con algodoncillo o muget provocada por *C. albicans*.

4.2.3.2 Infecciones de órganos profundos

Incluye la candidiasis del sistema nervioso central (SNC), cardíaca, urinaria, respiratoria, osteoarticular, ocular, candidiasis diseminada. La afección del SNC por *Candida* se suele producir en el contexto de una candidiasis sistémica, puede afectar el parénquima cerebral y las meninges. En el corazón, *Candida* puede causar endocarditis, miocarditis y pericarditis (Martínez, 1998).

La infección de la cavidad bucal por *Candida* es frecuente. El *muguet* es el término que se aplica a la aparición de placas blanquecinas que se observan en la lengua y otras partes de la boca y que pueden desprenderse con raspado dejando un lecho sangrante. Puede ser asintomático pero es usual la deglución dolorosa, la alteración del sabor de los alimentos y, como consecuencia, la pérdida de apetito y malnutrición (Regezi y Sciubba, 1995).

Aunque no siempre es así, la invasión a esófago se considera como la extensión de una candidiasis oral. En las paredes del esófago se forman pseudomembranas similares a las del *muguet*. Las lesiones producen desnervación del esófago por lo que en algunos casos pueden ser asintomáticas. Se suele presentar dificultad para la deglución, dolor retroesternal, náuseas, vómitos; puede ocasionarse hemorragias por ulceración y perforaciones (Regezi y Sciubba, 1995)

Candida es causa frecuente de vaginitis en mujeres, sean o no inmunodeficientes. Suele existir un flujo vaginal abundante y sobre todo predomina el escozor, la vagina y los labios presentan eritema que se puede extender al periné (Duerr *et al.*, 1993).

Dado que la principal fuente de infección por *Candida* es el propio paciente ya que es un hongo común en la superficies mucosas y la piel no existen medidas eficaces capaces de disminuir la exposición a este hongo (Martínez, 1998).



Figura 3. Candidiasis esofágica.

Aunque existen datos que indican que la profilaxis primaria con algunos antifúngicos como el fluconazol puede ser útil en la reducción del riesgo de sufrir candidiasis mucocutáneas (orofaríngea, esofágica y vaginal) en los pacientes con marcado deterioro de su inmunidad, no se aconseja su utilización rutinaria porque la candidiasis puede controlarse con el tratamiento adecuado, tiene baja mortalidad y la administración de antifúngicos puede favorecer la aparición de cepas resistentes (Hunter, 1998).

Existen discrepancias sobre si se debe utilizar profilaxis secundaria para evitar las recurrencias de las candidiasis que afectan a las mucosas (orofaríngea y vaginal) por motivos similares a los que se aportan para no realizar la profilaxis primaria (Diz *et al.*, 2001).

Sin embargo cuando la repetición del proceso da lugar a episodios frecuentes o severos se puede considerar la administración de un derivado azólico como el fluconazol oral o una solución de itraconazol (Sobel, 1992).

Para cada paciente se deben valorar las condiciones particulares que inciden: frecuencia y gravedad de las recurrencias, infecciones por otros hongos, deterioro de la calidad de vida, severidad de la candidiasis, interacciones con otros fármacos, toxicidad, posibilidad de desarrollar resistencias, etc. El uso prolongado de azoles con absorción sistémica aumenta el riesgo de desarrollo de resistencias a estos medicamentos, especialmente en pacientes con recuentos de linfocitos CD4 por debajo de 100 células/ μ L (Heinic, 1993).

4.2.4 Situaciones especiales

4.2.4.1 Niños

La profilaxis primaria de la candidiasis en niños seropositivos no está indicada. La terapia supresora crónica con azoles sistémicos se debe considerar en niños con candidiasis mucocutánea severas y recurrente, especialmente para los que tienen candidiasis esofágica (Heinic, 1993).

4.2.4.2 Embarazo

Se tiene experiencia limitada con el uso de antifúngicos en el embarazo. El itraconazol es abortivo y teratogénico. Con el empleo de fluconazol se han informado casos de malformaciones fetales, especialmente esqueléticas. Se piensa que efectos similares pueden presentarse con otros azoles como el ketoconazol. Por lo tanto se recomienda que durante el embarazo no se empiece profilaxis con azoles para las candidiasis vaginal, orofaríngea o esofágica y se debe interrumpir si la mujer queda embarazada (Heinic, 1993).



Figura 4. Candidiasis congénita en un neonato, se aprecian pápulas y pústulas que aparecen a las primeras horas de nacer.

4.2.5 Problemas con el diagnóstico convencional

Candida albicans es la levadura más común aislada en el laboratorio clínico, casi siempre requiere de 48-72 horas para tener colonias visibles en medio de cultivo. Asimismo, se requiere de dos a tres días para la completa identificación a nivel de especie del aislado, que incluye pruebas de producción de clamidiosporas, asimilación de carbohidratos y potasio, reacciones de fermentación y producción de ureasa (Jawetz *et al.*, 1987).

La mayoría de los laboratorios clínicos confían en la prueba de producción de tubo germinativo en colonias aisladas como presuntiva para identificación de *C. albicans* (Jawetz *et al.*, 1987). Sin embargo, la producción de tubo germinativo en cepas de *C. albicans* es producido en 1-2% de las especies (Perry y Miller, 1987).

Un novedoso sistema desarrollado para la identificación de levaduras que dura dos horas está basado en la detección de N-acetil-b-galactosaminasa y proliaminopeptidasa, éste reemplaza el ensayo de producción de tubo germinativo. Se ha observado que resulta sensible para la prueba de tubo germinativo para identificar *C.*

albicans, pero no es específico, asimismo, se pueden obtener falsos positivos como resultado al encontrar las muestras contaminadas por bacterias (Jawetz *et al.*, 1987).

La prueba de aglutinación en látex funciona para identificar *C. albicans*. Diferentes versiones han sido utilizadas para detectar antígenos de manosa de *Candida* (Kappe y Muller, 1991), antígeno enolasa (Walsh *et al.*, 1991) y D-arabinol (Wong y Brauer, 1988) en suero de pacientes. Sin embargo, este ensayo no es sensible y requiere altos niveles del hongo para su detección.

Los procedimientos de diagnóstico estándar no siempre son exitosos: los cultivos tardan varios días y además se puede presentar una diseminación de la enfermedad ya que se puede obtener un hemocultivo negativo; los métodos serológicos son problemáticos, ya que la producción de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos está reducida, un resultado positivo puede ser engañoso, y finalmente la sensibilidad de las pruebas de detección de antígenos no es suficiente para el diagnóstico (Unzaga *et al.*, 1997).

Los cultivos rutinarios basados en la identificación fenotípica de las especies de *Candida* de hemocultivos positivos requiere como mínimo un día para tener la posibilidad de obtener un cultivo puro, hay que tomar en cuenta tiempo adicional para identificar *C. albicans* por la formación del tubo germinativo, y dos o más días adicionales para identificar especies que no sean *C. albicans* por las pruebas de asimilación de azúcares o pruebas de fermentación además de su morfología en el agar harina de maíz. La introducción del CHROMagar *Candida*, un medio diferencial que contiene sustratos cromogénicos para la identificación de algunas especies de *Candida*, puede dar una rápida y presuntiva identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. krusei*; y aún así se requiere confirmación adicional del fenotipo de estas especies (Hee, 1997).

El tratamiento de las micosis plantea dos aproximaciones posibles: un tratamiento empírico ante la sospecha de la presencia de una micosis invasora, o un tratamiento específico ante una micosis confirmada. (Quindós, 2000).

El tratamiento empírico se realiza ante una inseguridad diagnóstica y conlleva un aumento del riesgo terapéutico, una potencial selección o inducción de resistencias farmacológicas y un incremento del consumo farmacológico. El tratamiento específico es más racional, más eficaz y plantea un menor riesgo. Sin embargo, es difícil realizar un

tratamiento específico en muchas micosis invasoras por los problemas diagnósticos que se plantean (Quindós, 2000).

4.2.6 Detección molecular de *Candida* spp.

En contraste con los métodos de diagnóstico convencional de *Candida* spp., las estrategias de amplificación basadas en la PCR proveen una rápida identificación aun y cuando *C. albicans* se encuentre en baja cantidad directamente de muestras de paciente, sin tener que recurrir al cultivo del organismo. Buchman *et al.*, (1990) amplificaron un fragmento de DNA de 243 p.b. del gen lanosterol-14-a-dimetilasa en muestras de orina, esputo, pus y sangre en poco menos de seis horas de una muestra de 100 µL con una sensibilidad de diez organismos detectados.

4.2.6.1 Diagnóstico molecular con PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ha sido recientemente aplicada para el diagnóstico de candidiasis sistémicas. Se utilizan los Oligonucleótidos fúngicos universales para amplificar un alto número de copias de un gen. La mayoría de los amplificados de las especies de *Candida* pueden ser separados y diferenciados por el tamaño que presenten en un corrimiento electroforético. Las ventajas de la PCR son, el tiempo relativamente corto de procesamiento y su alta sensibilidad y especificidad (Wahyuningsih, 2000).

4.2.6.2 Análisis genético de *Candida* en base a secuencias intergénicas ribosomales

Una opción para la determinación taxonómica es el análisis molecular de las secuencias que codifican para los genes de los ARN ribosomales (ARNr) eucariotes 18S, 5.8S y 28S. Estas secuencias son relativamente de fácil aislamiento, ya que son moderadamente repetitivas y son un blanco atractivo para los ensayos de PCR. Las regiones de estos genes se encuentran altamente conservadas y están separadas por dos espacios transcritos internos (ITS). Las regiones más conservadas se utilizan para la clasificación a niveles taxonómicos superiores (de género a *Phyllum*), mientras las regiones ITS menos conservadas, se utilizan a nivel de especie y subespecie (White *et al.*, 1990). Las diferencias en las secuencias ITS son efectivas para la diferenciación de

variedades y especies de *Gossypium* (Martsinkovskaya *et al.*, 1996), en la detección y clasificación de *Verticillium tricorpus* (Moukhamedov *et al.*, 1994), *V. dahliae* y *V. alboatrum* con indicadores específicos que diferencien entre estas dos especies que atacan un cultivo de interés económico (Nazar *et al.*, 1991). Además, los análisis con enzimas de restricción de las secuencias ITS han sido utilizadas para distinguir entre especies y aislamientos de nemátodos (Zijlstra *et al.*, 1995).

Mediante un tamizaje de las secuencias del gene para la subunidad grande del ARNr se desarrollaron oligonucleótidos específicos para detectar 5 especies de *Aspergillus*, 8 especies de *Candida*, y 8 diferentes géneros de hongos de importancia médica. Se secuenciaron cada uno de ellos y se desarrollaron oligonucleótidos específicos para cada especie así como sondas para hibridación *Northern blot* (Sandhu *et al.*, 1995).

Utilizando el método de polimorfismo conformacional de cadena de ADN sencilla (SSCP), el cual consiste en una PCR, desnaturalización del amplicón y corrimiento electroforético en acrilamida, se determinó la diferencia de género y especie de varios hongos. Con fragmentos amplificados por PCR del gen 18S ARNr de 197 p.b. se encontraron diferentes patrones de SSCP identificando diferencias entre géneros de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pseudallescheria* y *Rhizopus*. Por este método solo se puede distinguir diferentes patrones terciarios para diferenciar entre especies de *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus* (Walsh *et al.*, 1995).

Un método de análisis rápido y sensible para la detección de *C. albicans* en muestras de suero de pacientes infectados fue desarrollada basándose en la amplificación mediante PCR de las secuencias ITS del gene ARNr 5.8S (Wahyuningsih *et al.*, 2000).

El uso del análisis mediante RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) adicional al de la PCR del gene ARNr 5.8S ha sido extensamente utilizado para aumentar la sensibilidad de la prueba, de manera especial cuando no se amplifican secuencias altamente conservadas y solo se requiere distinguir entre *C. albicans* de no-*albicans* utilizando la enzima de restricción *HaeIII* (Yalinay *et al.*, 2003).

Recientemente, se han descrito un patrón complejo de identificación de especies de *Candida*, el cual consiste en la técnica de RFLP, utilizando como gen blanco las regiones ITS1 e ITS2 del ARNr 5.8S de dicho hongo. Se puede diferenciar entre al menos las seis principales especies patógenas de *Candida*, que son a mencionar *C.*

albicans, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. parapsilopsis* y *C. tropicalis*, aunque solo la aplicación de la PCR sin patrón de restricción es significativa para la diferenciación por tamaño del amplicón en el 50% de las especies estudiadas (Pinto *et al.*, 2004).

4.2.6.3 Uso de los oligonucleótidos ITS3 e ITS4.

El gen de la subunidad pequeña ribososomal eucariótica (18S ARNr), es el más conservado en el genoma y de esta manera presenta regiones de la secuencia que son idénticas en todos los hongos (Unzaga, *et al.*, 1997).

Los oligonucleótidos iniciadores son derivados de genes de ARNr de hongos, específicamente de regiones espaciadoras internas transcritas no codificantes (noncoding Internal Transcribed spacer) llamados ITS (Wahyuningsih *et al.*, 2000) y pueden ser usados en la PCR universal para hongos. El iniciador delantero ITS3 (5' – GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC- 3') corresponde al gen 5.8S ARNr, y el iniciador inverso ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') corresponde al gen 28S ARNr de los hongos. (Wahyuningsih, *et al.*, 2000) (Ver esquema No.1).

La PCR con iniciadores fúngicos específicos, amplificando las secuencias conservadas del ADN ribosomal (rADN) 5.8S y 28S, así como las de rADN 18S y 28S, resulta en la amplificación respectiva de la región del espacio transcrito interno (ITS) ITS 1 e ITS2, las cuales pueden variar en la medida del amplicón y en secuencia ya que estas regiones son específicas en cada especie. La variabilidad en el tamaño del producto obtenido por la amplificación tanto de la región ITS1 como de la región ITS2 pueden utilizarse para determinar la identificación específica de las cepas fúngicas, determinando la medida de los fragmentos de PCR usando la electroforesis en gel de agarosa (Fujita, 2001).

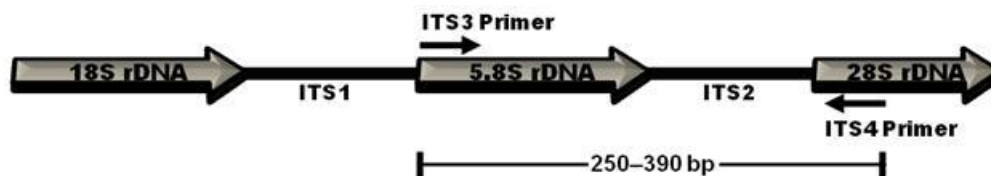


Figura 5. Representación esquemática de la distribución de los genes ribosomales en hongos. Se indica con flechas el sitio de unión de los iniciadores ITS3 e ITS4 así como también el tamaño de amplificados que se pueden obtener de siete especies de *Candida* de importancia clínica.

4.3 Aspergilosis

Es la enfermedad producida por gérmenes habitualmente saprofitas del género *Aspergillus*, son conocidos como mohos. Estos gérmenes puede producir enfermedad por distintos mecanismos tales como alergia, colonización o invasión. En el paciente inmunocomprometido, especialmente neutropénico, la enfermedad adopta una forma invasiva y diseminada grave (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

4.3.1 Etiología

Los agentes del género *Aspergillus* son mohos ubicuos, de distribución universal. Ampliamente diseminados en el ambiente, están presentes en el suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición. Su importancia como agentes de infecciones oportunistas es mayor, al aumentar la población de inmunodeprimidos. Aunque varias especies pueden estar implicadas, *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus* son las especies patógenas más frecuentes. Se han descrito brotes nosocomiales de la enfermedad, relacionados con trabajos de construcción en áreas del hospital o sus alrededores, donde están internados enfermos con neutropenia o receptores de transplantes. Aunque la neutropenia profunda y prolongada es el principal factor predisponente, otro factor lo constituye el tratamiento prolongado con corticoesteroides (Richardson y Warncok, 1997); sin embargo, reportes de infección causados por otras especies tales como *A.*

terreus, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. ustus* también han sido documentados (Iwen *et al.*, 1998).

A. fumigatus, con conidias de 1-3 μm de diámetro, es la especie más común encontrada en un 90% de las infecciones. Transportado por medio del aire, supera las habilidades defensivas del tracto respiratorio y penetra hasta los espacios alveolares distales. De ahí en adelante, germina en una hifa filamentosa angioinvasiva produciendo daños del tejido local, hemorragia, obstrucción y necrosis coagulativa (Ali *et al.*, 2006).



Figura 6. Fotografía en microscopio electrónico de barrido de *A. fumigatus* (Tomada de www.pasteur.fr)

La enfermedad se produce como consecuencia de la inhalación de esporas contenidas en el aire, por lo que los senos paranasales y los pulmones son los sitios en que asienta primariamente la enfermedad con mayor frecuencia. También pueden invadir el oído externo y la piel traumatizada. En personas inmunocompetentes pueden actuar como un potente alérgeno o colonizar bronquios o cavidades preexistentes, donde luego se desarrollan. En el inmunocomprometido neutropénico la enfermedad suele ser invasiva, diseminada, grave y muchas veces fatal (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2 Manifestaciones clínicas

Las diferentes formas clínicas que puede adoptar la enfermedad pulmonar dependen del mecanismo patogénico de acción, el estado inmunológico y la respuesta del huésped. Básicamente se distinguen 3 formas de enfermedad bronco-pulmonar: 1) aspergilosis alérgica donde el agente actúa como alérgeno, 2) aspergilosis por

colonización de cavidades, 3) enfermedad invasiva, la que puede ser aguda o crónica y donde el hongo es un agente infectante (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2.1 Aspergilosis alérgica

Se observa particularmente en personas atópicas que desarrollan reacciones alérgicas de asma o rinitis siguiendo a la inhalación de esporas de *Aspergillus* sp. El moco puede obstruir la vía aérea y causar atelectasia. A menudo la enfermedad evoluciona a la constitución de bronquiectasias y fibrosis. Por mecanismo de hipersensibilidad también puede producirse broncoalveolitis alérgica, a veces configurando una enfermedad laboral. Los síntomas más frecuentes son: fiebre, asma recurrente, tos productiva, malestar, pérdida de peso. *Aspergillus* sp. suele encontrarse en forma intermitente en el cultivo de esputo, por lo que es necesario realizar estudios de varias muestras (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2.2 Aspergiloma

Es una masa redonda fúngica que resulta de la colonización y desarrollo del hongo dentro de cavidades preexistentes (cavidades tuberculosas, bronquiectasias, quistes, etc.). Cuando el agente llega al alvéolo sano, es eliminado por los macrófagos alveolares. Pero si se introducen en cavidades preformadas, epitelizadas donde no hay macrófagos, puede desarrollarse una masa micelial. En inmunocompetentes el aspergiloma se observa en 10 a 15% de pacientes con enfermedad cavitaria. Aunque usualmente no ocasiona síntomas, más de 25% de los casos tienen hemoptisis masiva. Usualmente permanece estable por largo tiempo, aunque pueden sufrir un crecimiento lento o una resolución espontánea. En VIH negativos no es común que el aspergiloma progrese a enfermedad pulmonar invasiva, lo que sí puede verse en los infectados VIH con menos de 100 CD4/mm³. Comúnmente está localizado en el lóbulo superior y con menos frecuencia en el segmento apical del lóbulo inferior.

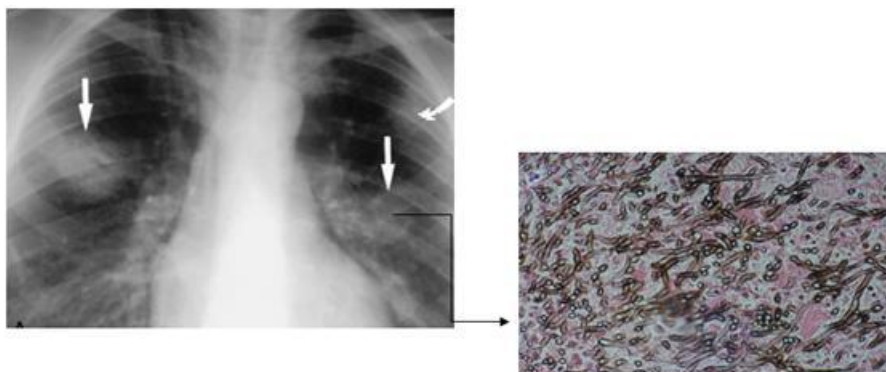


Figura 7. Aspergiloma. Las flechas indican el crecimiento micelial de *Aspergillus sp.* (Tomada de Dr. José Uberos Fernández).

La sintomatología es inespecífica y la hemoptisis es la complicación más grave ya que puede ser masiva y comprometer la vida. Para el diagnóstico se requiere aislar el germen en el estudio de varias muestras de esputo o proceder al aislamiento a partir de una muestra obtenida por punción transparietal torácica (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2.3 Aspergilosis pulmonar invasiva

Es una infección fúngica necrotizante que ocurren en pacientes inmunodeprimidos. Como el hongo tiene un importante tropismo vascular ocasiona trombosis y necrosis isquémica con la consecuente formación de cavidades. Según el grado de deterioro inmunitario puede adoptar la forma crónica o aguda (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2.4 Aspergilosis necrotizante crónica del pulmón o forma semiinvasiva

Se observa en personas de edad avanzada con enfermedad pulmonar subyacente como tuberculosis inactiva, enfermedad pulmonar de obstrucción crónica (EPOC), bronquiectasias, sarcoidosis, neumoconiosis. La sintomatología es inespecífica siendo los síntomas más frecuentes: tos, malestar, pérdida de peso, fiebre (Staples *et al.*, 1995). La lenta evolución da tiempo a la formación de anticuerpos específicos, cuya presencia apoya el diagnóstico (Flores *et al.*, 1994).

4.3.2.5 Aspergilosis invasiva aguda del pulmón

Es una complicación grave de cierto grupo de pacientes inmunodeprimidos, a menudo fatal aunque su diagnóstico sea hecho en vida y el enfermo tratado. El factor de riesgo más importante para esta forma de enfermedad es la granulocitopenia severa y prolongada, lo que se observa especialmente en pacientes sometidos a tratamiento intensivo de leucemia aguda y en receptores de transplantes. La enfermedad es rápidamente progresiva. La hemoptisis es poco frecuente. Es habitual la diseminación hematógena a órganos distantes. Las alteraciones radiológicas son variables e inespecíficas: infiltrado nodular que no remite con el tratamiento antibacteriano convencional, consolidación lobar, diseminación nodular, bronconeumonía, cavidades por necrosis. Un hecho característico de las consolidaciones parenquimatosas es la tendencia a cavar al recuperarse el número de neutrófilos. En la evolución pueden formarse pelotas fúngicas dentro de las cavidades (Staples *et al.*, 1995).

4.3.2.6 Aspergilosis extrapulmonar, traqueobronquitis y aspergilosis bronquial obstructiva

La traqueobronquitis aspergilar se observa con mayor frecuencia en receptores de transplante de pulmón y enfermos con SIDA. Puede evolucionar a la diseminación o causar la muerte por obstrucción de la vía aérea. En el examen broncoscópico se observan lesiones ulcerativas o pseudomembranas necróticas. La aspergilosis bronquial obstructiva fue descrita en pacientes con SIDA. Puede complicarse con atelectasia. De no ser tratada puede hacerse invasiva. El diagnóstico se hace por fibrobroncoscopía (Staples *et al.*, 1995).

4.3.2.7 Sinusitis

Se describen 5 formas de patología sinusal: 1) sinusitis alérgica, especialmente en personas con atopía. 2) sinusitis aguda invasiva, se observa en enfermos neutropénicos, en pacientes transplantados, pacientes con SIDA y otros pacientes inmunodeprimidos, clínicamente es similar a la mucormicosis rinoencefálica. 3) sinusitis necrotizante crónica, ocurre en los pacientes alcohólicos, diabéticos, que toman corticoides por

períodos prolongados, aunque hay casos descritos en personas sanas. 4) aspergiloma de los senos paranasales y 5) granuloma aspergilar paranasal, más común en zonas tropicales (Richardson y Warnock, 1997).

4.3.2.8 Aspergilosis en SIDA

Aspergillus es un patógeno poco común en pacientes con SIDA, siendo aun más infrecuente la forma pulmonar invasiva. Por tal motivo el CDC, que inicialmente había incluido la aspergilosis entre las patologías marcadoras del estadio SIDA, posteriormente la retiró. Su poca frecuencia en SIDA se debe a que los macrófagos y neutrófilos que constituyen la defensa contra *Aspergillus spp.* no son el blanco primario del VIH. Es posible que en el futuro aumente esta patología en SIDA a medida que se prolongue la vida de estos enfermos y permanezcan por más tiempo en un estado de severa inmunodepresión. Aunque los factores predisponentes de la enfermedad invasiva aun no son bien conocidos clásicamente se aceptan como factores de riesgo para padecerla: la leucopenia grave y prolongada y la administración prolongada de corticoides. Sin embargo se observó aspergilosis invasiva en pacientes con SIDA en ausencia de dichos factores pero casi todos con niveles de $CD4 < 50/mm^3$. En pacientes con VIH/SIDA la neutropenia a menudo resulta de la terapia antiretroviral administrada. En este grupo de enfermos se han mencionado otros posibles factores de riesgo como la administración reciente de antibióticos de amplio espectro, el abuso de alcohol o drogas intravenosas. La neumonía por *Pneumocystis jiroveci* es también un factor de riesgo para el aspergiloma. En 10% de las personas que padecieron neumonía de esa etiología se documentó la presencia de quistes los que pueden posteriormente ser colonizados por el hongo (Miller *et al.*, 1994).

En los infectados por el VIH se pueden observar todas las formas de enfermedad producidas por *Aspergillus spp.*, lo que se correlaciona con los distintos grados de disfunción de los neutrófilos y macrófagos. La forma clínica más común descrita es la enfermedad cavitaria crónica, similar a las formas no invasiva y semiinvasiva de los huéspedes no inmunodeprimidos o con alteraciones no específicas de las funciones inmunes. Por eso el hallazgo de cavidades únicas o múltiples de paredes irregulares y gruesas del lóbulo superior hacen sospechar aspergilosis si el paciente está gravemente

inmunodeprimido por VIH. Imágenes similares pueden ser causadas por otras patologías: abscesos piógenos, embolias sépticas, otras micosis, linfoma, carcinoma broncogénico, pneumocistosis. La hemoptisis es una causa común de muerte en esas formas y la resección quirúrgica puede ser exitosa en casos seleccionados. Otras formas observadas son: a) infiltrado alveolar focal que puede simular una neumonía bacteriana y es similar a la forma invasiva aunque, a diferencia de lo que ocurre en los enfermos inmunodeprimidos no infectados por el VIH, en varios pacientes los infiltrados permanecieron estables por meses. La evolución puede ser a la curación con tratamiento o progresar a enfermedad diseminada. b) opacidades bilaterales (reticular, retículo-nodular, alveolar), similar a la forma invasiva, con alta mortalidad, c) bronquial (aspergilosis bronquial obstructiva y aspergilosis bronquial pseudomembranosa necrotizante), con expectoración e hipoxia. Es una nueva forma de aspergilosis que invade las paredes bronquiales y los tejidos peribronquiales, posiblemente específica de los pacientes con SIDA. Se demuestra por broncoscopía. Puede causar la muerte por obstrucción de la vía aérea (Miller *et al.*, 1994).

En pacientes con SIDA la hemoptisis es poco frecuente pero puede comprometer la vida del enfermo, se ha observado preferentemente en dos grupos de pacientes: aquellos con aspergilosis bronquial y en las formas cavitarias del lóbulo superior. En los primeros fue de poca entidad pero no así en los segundos donde puede ser fatal. En estudios efectuados en autopsias, se detectaron localizaciones extrapulmonares de la aspergilosis, pareciendo que el compromiso del SNC es más frecuente en infectados VIH que en otras poblaciones (Miller *et al.*, 1994).

4.3.2.9 Aspergilosis en transplantados

El número de pacientes sometidos a trasplantes se ha incrementado exponencialmente en los últimos años. Un estimado de 15,000 trasplantes de células madre alogénicas y 25,000 trasplantes de células madre autólogas se realizan anualmente en el mundo. Durante los años de 1998 al 2002 se realizaron un total de 113,682 cirugías para trasplante de órganos sólidos en los Estados Unidos, en promedio 22,736 anualmente (Singh y Paterson, 2005).

La incidencia de aspergilosis invasiva se aproxima a un 5% entre las poblaciones con transplantes de pulmón, hígado y corazón, sin embargo es considerablemente menos frecuente en un transplante de riñón. La aspergilosis invasiva es la más comúnmente diagnosticada durante los primeros 6 meses y casi siempre involucra los pulmones. Su diseminación a sitios distantes, particularmente al cerebro, ocurre en una considerable minoría de los pacientes (Kotloff *et al.*, 2004).

La aspergilosis invasiva ha sido documentada entre el 1 y el 8% de los transplantes ortotópicos de hígado y generalmente ocurre entre los 3 primeros meses post-transplante. La disfunción hepática o la renal que requiere diálisis y la hepatitis fulminante como indicación del procedimiento parecen asociarse a una alta tasa de infección invasiva por *Aspergillus*. Las presentaciones clínicas mas frecuentes incluyen la participación pulmonar en el 90% de los casos y del SNC concomitante entre el 10 y el 50%. El patrón de la primera es en forma de infiltrados, nódulos o en el contexto de formas diseminadas. La clínica de la afectación del SNC incluye alteraciones inespecíficas del estado mental y convulsiones entre otros. Los déficits focales y el meningismo son más inusuales. La tasa de mortalidad es del 83%, y superior si existe participación del SNC (García-Ruíz *et al.*, 2004).

En cuanto a transplante cardíaco, las infecciones por *Aspergillus spp.* son las descritas con mayor frecuencia. Estas infecciones se desarrollan más frecuentemente entre los primeros tres meses del transplante. Recientemente han sido descritos los factores de riesgo para aspergilosis invasora en los receptores de este tipo de transplante que esencialmente son: reintervención, enfermedad por citomegalovirus, hemodiálisis postransplante y aspergilosis previa (García-Ruíz *et al.*, 2004).

En cuanto a transplante pulmonar, aproximadamente la mitad de las infecciones fúngicas invasoras en este tipo de transplante son producidas por *Aspergillus spp.* Las formas clínicas de presentación no difieren de otros grupos de pacientes aunque la traqueobronquitis es una entidad que se presenta exclusivamente en este grupo de enfermos. Se caracteriza por la presencia endobronquial desde lesiones inflamatorias inespecíficas hasta pseudomembranas con el desarrollo posterior de úlceras. Esta situación puede progresar a una infección localmente invasiva o afectar las anastomosis produciendo fístulas broncopleurales. Estas zonas desvascularizadas son muy

susceptibles a la infección por *Aspergillus*. La mayoría de estas infecciones se producen entre los tres y seis meses post-transplante (García-Ruíz *et al.*, 2004).

La infección diseminada o invasiva por *Aspergillus* permanece como una importante causa de morbilidad y mortalidad entre los receptores para transplante de pulmón, con un rango de 2-33% en infecciones post-transplante y de 4-7% en todas las muertes en transplante de pulmón. La infección fúngica invasiva causada por *Aspergillus* es una complicación fatal frecuentemente en los trasplantes de pulmón. Esto se confirmó en el estudio realizado por Cahill *et al.*, (1997) donde la enfermedad invasiva tuvo una mortalidad del 100%, 4 de los 5 pacientes con enfermedad invasiva desarrollaron infección fúngica en el pulmón transplantado. El pulmón es el único órgano de transplante que se encuentra en contacto directo con el medioambiente, este hecho puede facilitar la colonización vía aérea de *Aspergillus* en los pacientes (Cahill *et al.*, 1997).

El pulmón es el sitio primario más común de la aspergilosis invasiva, desde este foco de infección se cree que ocurre la diseminación. También pueden ocurrir infecciones primarias de otros sitios, siendo las cavidades nasales y la piel los más comúnmente reportados. Existe un caso de aspergilosis invasiva cutánea primaria causado por *A. ustus* en un paciente con transplante de hígado (Iwen *et al.*, 1998).

Los abscesos piogénicos y metástasis en el cerebro tienen una predilección conocida por la unión corticomedular; debido a la ruta hematógica de diseminación de bacterias, de células malignas y a la anatomía vascular de esta interfase. Mientras que *Aspergillus* también se disemina al SNC por vía hematógica, muy frecuentemente pero no exclusivamente desde el pulmón, la patofisiología es frecuentemente diferente. *Aspergillus* puede causar una vasculopatía infecciosa, llevando inicialmente a una embolia aguda o hemorragia y posteriormente extendiéndose alrededor del tejido como una cerebritis infecciosa u ocasionalmente evolucionando en un absceso. Esta vasculopatía mediada por una embolia séptica tiene una ubicación anatómica y apariencia radiológica significativamente diferente de otras embolias y de otras cerebritis primarias o abscesos (DeLone *et al.*, 1999). El cerebro es el sitio mas frecuente de una infección invasiva extrapulmonar causada por *A. fumigatus* y *A. flavus*. No obstante, la

diseminación hacia el corazón es común en infecciones causadas por *A. terreus* (Iwen *et al.*, 1998).

Las especies de *Aspergillus* son reconocidas como los principales patógenos fúngicos en pacientes neutropénicos o severamente inmunosuprimidos, particularmente después de transplante de células hematopoyéticas alogénicas. La manifestación más común de una infección causada por *Aspergillus* en estos pacientes es una aspergilosis pulmonar invasiva la cual se caracteriza por invasión de hifas y destrucción del tejido pulmonar. La diseminación hematógena como un evento secundario ocurre en un 20-50% de los casos en estos pacientes y comúnmente involucra al SNC y al tracto gastrointestinal. Las infecciones extrapulmonares por *Aspergillus* son encontradas comúnmente en las cavidades maxilares y colonizando las cavidades nasales lo cual puede llevar a una diseminación endógena hacia los pulmones resultando en una aspergilosis pulmonar invasiva. La piel es un sitio raro de infección, las infecciones cutáneas son más frecuentemente encontradas en el sitio de entrada de los catéteres Hickman (Schimmelpfennig *et al.*, 2001).

La aspergilosis invasiva es la principal causa de muerte en la neumonía nosocomial y transplante de médula ósea, con un rango de infección estimado de entre 8-15% y un rango de mortalidad aproximado de 90% (Gaziano *et al.*, 2004).

En los receptores de transplante de riñón la aspergilosis invasora ha sido reportada en 0.7%-4%, observando como factores de riesgo la terapia prolongada con corticoesteroides en altas dosis, la falla del órgano transplantado y una potente terapia inmunosupresiva. El rango de mortalidad en receptores de transplante de riñón con aspergilosis invasora es de 75-80%. (Singh y Paterson, 2005).

4.3.2.10 Aspergilosis en neonatos

Los neonatos prematuros tienen un riesgo en aumento de desarrollar infecciones fúngicas, presumiblemente por el deterioro de la función fagocítica. Los reportes han descrito aspergilosis cutánea primaria a 5-30 días después de nacidos en neonatos prematuros con un peso entre 800 a 1,500g. Todos estos casos involucraron daños mecánicos en la función de barrera protectora de la piel como son cinta adhesiva,

cinta adhesiva para intubación, oclusión bajo un sensor oxímetro y una colocación prolongada en la posición supina(tendido sobre el dorso). La aspergilosis cutánea en neonatos tiene un rango de lesiones incluyendo pápulas, nódulos, pústulas y úlceras. Los neonatos con una fuerte infección reciben tratamiento médico con una tasa de 50% de sobrevivencia. Asimismo, las muertes causadas por una aspergilosis cutánea diseminada han sido reportados en neonatos a los 18 días y 32 días de nacidos (van Burik *et al.*, 1998).

4.3.2.11 Aspergilosis en cáncer

Los reportes en la literatura han descrito aspergilosis cutánea en más de 50 pacientes con cáncer. Aunque la mayoría de estos pacientes presentaban leucemia como el diagnóstico oncológico fundamental, también se han descrito en otras enfermedades, incluyendo anemia aplástica, astrocitoma, enfermedad granulomatosa crónica y agranulocitosis tratada con globulina anti-timocítica. En más de 85% de los casos de cáncer reportados, la aspergilosis cutánea primaria se asoció con catéteres intravenosos, contaminación de la base para canalizar vía intravenosa y cintos para inmovilizar brazo para canalizar. Otras asociaciones incluyeron cortes en el epitelio durante la inserción de clotrimazol vía óvulos vaginales y flebotomías. La extensión directa desde los senos nasales es la explicación para la mayoría de los casos de aspergilosis cutánea secundaria, aunque se han descrito embolias e inoculación por medio de agujas para biopsias percutáneas como fuentes de infección secundaria. Además, Buescher *et al.*, reportaron un paciente con una infección por *Aspergillus* en un catéter Hickman provocando una trombosis de venas subclavias que requirió extracción quirúrgica y reconstrucción para el control de la infección. En otro caso, un aspergiloma pulmonar invadió la arteria subclavia izquierda con un desarrollo subsecuente de una lesión en la extremidad superior izquierda (van Burik *et al.*, 1998).

La incidencia reportada de aspergilosis probada o probable en pacientes con leucemia aguda tiene un rango de 6-12% en un estudio que incluyen adultos como niños. Los datos confirman que los hongos son los responsables de la mayoría de las infecciones fúngicas invasoras, y que la aspergilosis es la complicación más frecuente en pacientes con padecimientos hematológicos (Pagano *et al.*, 2006).

4.3.3 Tratamiento

Se plantea la cirugía para el tratamiento de aspergilosis encefálica, senos paranasales, válvula cardíaca, aspergiloma pulmonar que causó hemoptisis, lesión pulmonar localizada y única. La anfotericina parenteral no es efectiva para tratar el aspergiloma (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

Como plan de alternativa para los aspergilomas que por motivos del estado del enfermo no son operables, se administra anfotericina B intracavitaria a través de un catéter implantado por vía transtorácica, o por fibrobroncoscopía. Se ha observado que con la anfotericina intracavitaria se detiene la hemorragia (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

La anfotericina B por vía intravenosa es el fármaco de elección para las formas invasivas o diseminadas. El itraconazol es una droga de alternativa, atractiva porque es activa por vía oral y sin riesgos tóxicos. El mal resultado obtenido en SIDA quizá se vincule a su mala absorción (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

4.3.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la forma invasiva se hace por demostración de la invasión fúngica tisular y el aislamiento del germen en cultivo. El estudio serológico puede ser útil para las otras formas de aspergilosis. El aislamiento en cultivo a partir de secreciones respiratorias, orina, heces, córnea o heridas, tiene poca especificidad diagnóstica. El cultivo de esputo positivo en un paciente con neutropenia profunda y sintomatología pulmonar es sugestivo de aspergilosis. El diagnóstico de aspergilosis pulmonar en el paciente inmunocomprometido es difícil porque las manifestaciones clínicas son inespecíficas y raramente el agente es aislado de sangre, médula ósea o esputo. Además la serología habitualmente es negativa (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

En la interpretación del resultado del estudio microscópico hay que recordar que *Aspergillus spp* puede ser un contaminante del ambiente o estar presente en los alimentos ingeridos o bien ser saprófitos de la orofaringe o la vía respiratoria, por lo que la presencia de hifas en esputo no hace el diagnóstico de enfermedad, ya que si el paciente tiene una candidiasis orofaríngea, puede confundirse al observarse pseudohifas. El

diagnóstico es más probable si se observan varias colonias en la placa o el mismo agente es identificado en varias muestras (Torres-Rodríguez y Brunet, 1991).

Para las formas de aspergilosis alérgica el diagnóstico definitivo depende del aislamiento del hongo en cultivo de esputo, lo que es menos exitoso para las otras formas. Habitualmente se necesita recurrir a técnicas invasivas: fibrobroncoscopía con lavado broncoalveolar o punción aspirativa transtorácica si la lesión es periférica. La biopsia es un método óptimo de diagnóstico pero a menudo es difícil de realizar en los pacientes severamente enfermos (Richardson y Warnock, 1997).

El diagnóstico de aspergilosis sinusal es menos difícil. Usualmente puede aislarse por lavado del seno o biopsia de las lesiones de nariz o paladar. En pacientes con SIDA la mortalidad por esta enfermedad es de 50%, siendo la causa de muerte la hemoptisis o su diseminación. Los que mejoran con el tratamiento mueren en pocos meses por otra causa (Richardson y Warnock, 1997).

4.3.5 Diagnóstico de infecciones fúngicas

El diagnóstico de micosis sistémicas es a la fecha uno de los mayores retos para los estudios clínicos. Lo anterior en parte por la ausencia de técnicas rápidas y sensibles para detectarlos (Markin *et al.*, 1990). El mejor diagnóstico se realiza por observación directa del microorganismo en tejido. Sin embargo, en la mayoría de los casos el obtener una biopsia es poco factible o si la lesión es pequeña se puede perder durante el muestreo, en cualquier caso no se podría realizar un examen directo a la muestra para detectar al organismo sin antes realizar una amplificación del mismo.

La amplificación o incremento del número de organismos dentro de una muestra clínica es muy común por las técnicas de cultivo. Sin embargo, el poder obtener un cultivo puro puede llevar tiempo y alto consumo de reactivos. Aun con estas técnicas, las micosis sistémicas son difíciles de detectar. Del 40-60% de cultivos de sangre permanecen negativos aun cuando el paciente presenta una infección sistémica (Ellis y Spivak, 1967) y muchas veces oculta, ésta no se diagnostica hasta la autopsia (Baley, 1984).

La estrategia aplicada en la amplificación por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) disminuye el tiempo del proceso de cultivo del organismo generando un alto número de copias de segmentos de ADN fúngico. Las propiedades de amplificación de esta prueba junto con el breve tiempo que se lleva para aplicarla la hacen ideal para el diagnóstico de organismos infecciosos en material clínico.

4.3.6 Diagnóstico microbiológico de aspergilosis

El diagnóstico microbiológico tradicional de la aspergilosis depende de la presentación clínica y se basa en la sospecha clínica y la posterior confirmación microbiológica y anatomopatológica. En las aspergilosis superficiales el examen directo y el cultivo permiten apoyar el diagnóstico clínico presuntivo. En enfermos con aspergilosis pulmonar invasiva el examen directo del esputo suele ser negativo, siendo positivo, por el contrario, el examen microscópico del lavado broncoalveolar. En las formas de aspergilosis invasora cutáneas o de senos (muestras de lavados) se pueden observar micelios tabicados. El examen directo con KOH, calcoflúor o gram permite un diagnóstico presuntivo rápido. El examen de tejidos obtenidos por biopsia teñidos con PAS o plata metenamina permite visualizar filamentos septados con ramificaciones en ángulo agudo. El problema estriba en que otros patógenos fúngicos, como *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp., son indistinguibles morfológicamente. Una mayor especificidad puede conseguirse mediante técnicas inmunohistoquímicas, combinando calcoflúor y anticuerpos específicos.

El aislamiento de *Aspergillus* por cultivo es un método sensible para detectar la infección y permite la identificación de la especie infectante y la realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Aspergillus* spp. no es exigente en sus requerimientos nutritivos y el microbiólogo debe tener en cuenta que cuando se sospecha una infección por este género no debe utilizarse la cicloheximida en los medios de cultivo, porque inhibe su crecimiento. Aunque generalmente las especies patógenas humanas son capaces de crecer por encima de 37°C, los medios de cultivo deben ser incubados a 25-37°C durante cuatro semanas y utilizando tubos en lugar de placas, ya que la deshidratación de los mismos después de cuatro semanas es menor. El medio de cultivo más utilizado para diferenciar las distintas especies es el agar Czapeck-Dox (del Palacio *et al.*, 2003).

Dado que *Aspergillus* es contaminante frecuente, el cultivo tiene una especificidad variable, ya que no permiten discriminar entre colonización e invasión, ni descartar la contaminación. Por ejemplo, el aislamiento de *Aspergillus* en esputo, una de las muestras que se procesan con mayor frecuencia, puede ser consecuencia de la inhalación de conidios y no de una infección pulmonar.

El valor predictivo aumenta si se obtienen cultivos con múltiples colonias o se aíslan repetidamente en esputos seriados. Algunos estudios han demostrado que hasta el 20% de los cultivos de esputo pueden ser falsos positivos en receptores de un trasplante de médula ósea, siendo el porcentaje incluso más alto en receptores de trasplante de órgano sólido. El valor predictivo del cultivo también depende de los factores de riesgo del paciente. Así, Perfect *et al.*, (2001) observaron que en los enfermos con riesgo alto, un cultivo positivo se asocia con aspergilosis invasora en el 50-64% de los casos, mientras que en los enfermos con riesgo intermedio la incidencia de aspergilosis invasora desciende al 8-28%. La rentabilidad de las muestras microbiológicas es mayor si se obtienen mediante broncoscopía (aspirados y cepillados bronquiales, lavado broncoalveolar). En este caso, la rentabilidad de las muestras se sitúa en torno al 50%. En los receptores de trasplante de médula ósea los cultivos positivos de *Aspergillus* tienen un valor predictivo muy alto (en torno al 70-80%). La obtención de biopsias mediante agujas guiadas radiológicamente es un procedimiento diagnóstico muy rentable, en general desprovisto de complicaciones, si bien pueden obtenerse falsos negativos si no se toma el tejido invadido por el micelio (Perfect *et al.*, 2001).

Dados los problemas de especificidad que presenta el cultivo, su correcta valoración requiere la utilización conjunta de la histología, el patrón de referencia (*gold standard*) que permite establecer de forma probada en pacientes cancerosos e inmunodeprimidos la existencia de micosis invasora por hongos filamentosos según los criterios conjuntos de la EORTC y el *Mycoses Study Group* de la NIAID. Sin embargo, el problema en enfermos neutropénicos y cancerosos es que las biopsias pulmonares, lavados broncoalveolares, etc., están contraindicados, ya que habitualmente tienen trombocitopenia, hipoxemia y mal estado general. La diferenciación entre colonización e invasión en heridas y quemaduras también requiere el estudio simultáneo microbiológico e histológico, lo que conlleva la realización de biopsias. La infiltración de tejido viable por micelios tabicados demuestra de forma concluyente la invasión fúngica. Un problema importante de las pruebas tradicionales de

diagnóstico microbiológico es que se positivizan tardíamente en el curso clínico de la aspergilosis invasora (Barnes y Denning, 1993).

Las aspergilemias son excepcionales, representando del 0.5% al 2% de las fungemias, y son consecuencia de la invasión tisular. Es un hecho bien conocido que *Fusarium* spp. y *Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium prolificans*) son las especies causantes de fungemia en las formas diseminadas de micosis invasora, siendo excepcionales las fungemias causadas por zigomicetos. Las aspergilemias son más frecuentes en las endocarditis causadas por *Aspergillus* spp. Se estima que solo aproximadamente el 10% de las aspergilemias son significativas, debiéndose a contaminaciones el 90% de las fungemias no significativas conocidas como pseudoaspergilemias (del Palacio *et al.*, 2003).

En pacientes con cáncer hematológico, la aspergilemia verdadera es de aparición tardía (precede solo en un día al *exitus* o se evidencia en la necropsia), incluso en pacientes con alto riesgo de padecer aspergilosis invasora. El aislamiento de *A. terreus* en hemocultivo hace más probable que la aspergilemia sea verdadera (Kontoyiannis *et al.*, 2000).

4.3.7. Diagnóstico molecular de aspergilosis

4.3.7.1. Secuencias intergénicas de los genes ribosomales de *Aspergillus*

Una opción para la determinación taxonómica es el análisis molecular de las secuencias que codifican para los genes de los ARN ribosomales (ARNr) de eucariotes 18S, 5.8S y 28S (Figura 1). Estas secuencias son relativamente de fácil aislamiento, ya que son moderadamente repetitivas y son un blanco atractivo para los ensayos de PCR. Las regiones de estos genes se encuentran altamente conservadas y están separadas por dos espacios transcritos internos (ITS). Las regiones más conservadas se utilizan para la clasificación a niveles taxonómicos superiores (de género a Phylum), mientras las regiones ITS, menos conservadas, se utilizan a nivel de especie y subespecie (White *et al.*, 1990). Las diferencias en las secuencias ITS son efectivas para la diferenciación de variedades y especies de *Gossypium* (Martsinkovskaya *et al.*, 1996), en la detección y clasificación de *Verticillium tricorpus* (Moukhamedov *et al.*, 1994), *V. dahliae* y *V. alboatrum* con indicadores específicos que diferencien entre estas dos

especies que atacan un cultivo de interés económico (Nazar *et al.*, 1991). Además, los análisis con enzimas de restricción de las secuencias ITS han sido utilizadas para distinguir entre especies y aislamientos de nemátodos (Zijlstra *et al.*, 1995).

En esta última década, se han desarrollado técnicas para la detección de ADN de *Aspergillus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque al no existir todavía técnicas comercializadas no se han implantado de forma rutinaria en el laboratorio asistencial. Inicialmente, los estudios se centraron en la detección de ADN del género *Aspergillus* pero también se están utilizando cebadores universales con la finalidad de detectar levaduras y hongos filamentosos. Puesto que no existen técnicas comercializadas, todos los estudios se han realizado con técnicas desarrolladas en cada laboratorio, lo que aumenta la variabilidad y dificulta la comparación de resultados. Aunque se puede detectar ADN fúngico en la mayoría de las muestras clínicas, las muestras respiratorias presentan problemas para su estudio con técnicas moleculares porque es difícil diferenciar al portador asintomático o transitorio de *Aspergillus* spp. del que presenta una aspergilosis invasora, ya que el 25% de la población sana presenta PCR positiva para *Aspergillus* en muestras respiratorias.

La cuantificación de la carga fúngica mediante la realización de PCR en tiempo real puede ayudar a solucionar este problema. La muestra idónea es la sangre (sangre entera, suero, plasma), prefiriéndose la sangre entera (sin coagular), puesto que la sensibilidad de la PCR en el plasma es menor. Utilizando sangre entera de enfermos con aspergilosis invasora documentada, la sensibilidad de la prueba es del 100% cuando se estudian dos o más muestras.

Dada la enorme sensibilidad (la detección de ADN por PCR es, aproximadamente, 20 veces más sensible que el cultivo, detectándose de 1-10 fg de ADN fúngico ó 1-5 UFC/ml), las técnicas de PCR pueden ser muy útiles como herramienta de monitorización del tratamiento antifúngico. En pacientes con aspergilosis invasora, el número de muestras PCR positivas descende en los que tienen una respuesta favorable al tratamiento, lo que no sucede en los que no responden al mismo. La cuantificación de la carga fúngica mediante PCR en tiempo real en sangre periférica puede aplicarse en la monitorización terapéutica, siendo un procedimiento rápido, específico y muy sensible en la detección y cuantificación de ADN de *A. fumigatus*. Actualmente no está claro si la

detección de ADN es más sensible que la detección de galactomanano en el diagnóstico de la aspergilosis invasora. En un estudio realizado por Kami *et al.*, se observó que la PCR en tiempo real era más sensible que el estudio de antígenos en pacientes onco-hematológicos con neutropenia prolongada (media de 39 días). Los resultados obtenidos por PCR fueron comparados entre la detección de galactomanano por Platelia®*Aspergillus* (punto de corte 1,5 ng/ml, considerándose positivas al menos dos muestras) y Fungi-Tec, siendo interesante reseñar que la positividad por PCR precedió a la de galactomanano en 2,8 días y a la del Fungi- Tec en 6,5 días. Sin embargo, en otro estudio realizado, Costa *et al.*, observaron que la detección de galactomanano era más sensible (52% vs. 45%) que la PCR en tiempo real para establecer el diagnóstico de aspergilosis invasora, al igual que Sanguinetti *et al.*, que describen una sensibilidad mayor en la detección de galactomanano (100% vs. 90%) que la PCR en tiempo real para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasora. (del Palacio *et al.*, 2003).

Actualmente se conoce poco sobre el origen y la cinética del paso de ADN fúngico a la sangre. Se ha sugerido que la respuesta del huésped al hongo impediría la liberación de ADN desde el lugar anatómico donde asienta la infección al torrente circulatorio cuando el grado de angioinvasión es menor. También desconocemos cómo circula por la sangre y cómo es metabolizado, o cómo desaparece de la sangre, hechos esenciales para intentar establecer el calendario de obtención de muestras para el estudio de ADN. (del Palacio *et al.*, 2003).

4.3.7.2. Estrategias de amplificación por PCR: Aplicaciones específicas

Las especies de *Aspergillus* son patógenos oportunistas que pueden ser identificados directamente por observación de una biopsia por sus conidiosporas características (Phillips y Weiner, 1987). Asimismo, se pueden utilizar técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales con el propósito de llevar a cabo su identificación (Phillips y Weiner, 1987). Por otra parte, si el examen directo no revela la presencia del hongo, la muestra puede ser cultivada en agar Sabouraud para obtener

cultivos puros, este proceso en promedio lleva 3 semanas para realizarlo (Jawetz *et al.*, 1987).

En contraste, se han aplicado dos técnicas de PCR para amplificar porciones de genes de *Aspergillus nidulans* (Burger *et al.*, 1991) o *Aspergillus niger* (Inoue *et al.*, 1991). Burger *et al.*, (1991) utilizaron una variedad de combinaciones de oligonucleótidos para amplificar ocho diferentes regiones del gene regulador de la asimilación del nitrógeno *nirA* de *Aspergillus nidulans*. Inoue *et al.*, (1991) utilizaron una mezcla de oligonucleótidos para aislar el gene de la ácido proteinasa A de *A. niger*. Ninguno de los dos grupos de investigación reporta la especificidad o sensibilidad obtenida con los oligonucleótidos tipo específico para *Aspergillus*. Los templados utilizados en ambos casos se obtuvieron de cultivos puros. Estas técnicas de extracción son usuales para obtener ADN fúngico como material de referencia, sin embargo no proporcionan las condiciones óptimas para extraerlo de muestras clínicas.

Asimismo, el gen para ADN Topoisomerasa II ha sido utilizado para la identificación de especies de hongos oportunistas como *Aspergillus spp.* mediante PCR anidado, obteniendo alta sensibilidad y especificidad en aislados clínicos (Kanbe *et al.*, 2003).

Mediante el uso de la técnica de polimorfismo conformacional de ADN de cadena sencilla (SSCP), se llevó a cabo la identificación de diferentes hongos de importancia médica, dicha técnica enfocada al gen del ARNr 18S fue capaz de mostrar diferencias en las secuencias ITS estudiadas a nivel del taxón *Género*, y solo fue capaz de mostrar diferencias en el peso molecular generado por la conformación del amplicón a nivel de especie entre *A. fumigatus* y *A. flavus* (Walsh *et al.*, 1995).

Se determinaron las secuencias del gen ARNr 28S de 50 especies de hongos patógenos para buscar los oligonucleótidos específicos universales e identificar mediante PCR y sondas de hibridación cada uno de los organismos. Mediante dicha técnica, no se observan en las sondas desarrolladas la aparición de resultados falso positivos, sin embargo se encuentra la efectividad de la prueba entre un 80 a 100% de confiabilidad (Shandhu *et al.*, 1995).

Al probar el uso de las regiones ITS1 e ITS2 del gen rARN 5.8S mediante PCR se encuentra que las especies de *Aspergillus* se encuentran los productos amplificados entre

565 a 613 pb, por lo tanto, se requiere de una prueba más sensible que el solo uso de estas secuencias para diferenciar entre especies del género *Aspergillus* (Henry *et al.*, 2000).

El estudio mediante un fino protocolo revela la especificidad (100%) y sensibilidad (100%) en la detección e identificación de especies de *Aspergillus* de 601 aislados clínicos de cuatro grupos de pacientes *in vitro* e *in vivo* al utilizar amplificación por PCR del gen ARNr 18S (Einsele *et al.*, 1997).

En un estudio con el uso de oligonucleótidos específicos para amplificar regiones conservadas del ARNr 18S, 5.8S y 28S, se llevó a cabo la identificación de hongos de importancia médica y de saprófitos, encontrando que el uso de estos genes muestran un alto grado de sensibilidad para identificar *Aspergillus fumigatus* y especies relacionadas (Zhao *et al.*, 2001).

En la actualidad, los métodos empleados para la detección e identificación de organismos involucrados en micosis sistémicas requieren de un periodo de tiempo largo de cinco días, lo cual causa el retraso en la decisión del experto para aplicar un tratamiento efectivo al paciente.

Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo llegar a un diagnóstico temprano a través de la identificación de especies del género *Candida spp* y *Aspergillus spp* en aislados de muestras clínicas de pacientes mediante PCR/RFLP, la cuál redundará en la selección de antifúngicos efectivos para el tratamiento efectivo de los pacientes con compromiso inmunológico.

5. MÉTODOS

5.1 Cultivos de colección

El material biológico de colección fue proporcionado por el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control Enfermedades de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las especies de las cepas de colección para los hongos levaduriformes fueron identificadas mediante el sistema API 20C AUX (bioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo.); en el caso de los hongos filamentosos se identificó por métodos convencionales de morfología de colonia y morfología microscópica.

5.2 Preparación de los cultivos y extracción del ADN

Los hongos se inocularon en 3 ml de caldo YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona de caseína y 2 % dextrosa, Mca. Difco, USA), posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en agitación a 230 rpm en una incubadora orbital Brinkmann Orbimix 1010-Incubator 1000. La extracción de ADN para las levaduras se realizó conforme a la descrita por Sambrook y Russell (Sambrook y Russell 2001); en el caso de los hongos filamentosos se empleó el método de Jin *et al.*, (Jin, 2004).

5.2.1 Método de extracción de DNA por Sambrook y Russell, 2001 para levaduras

Posterior a la incubación de las levaduras ya descrito, se transfirieron 1.5 mL del mencionado cultivo a tubos eppendorff y se centrifugaron a 4,000 rpm. por 4 min. a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y las levaduras se resuspendieron en 50 µL de buffer STES (10mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS), se mezcló por inversión diez veces, se agregó 1 volumen de glass beads (212-300 Micrones, Sigma-Aldrich) y se agitó vigorosamente por 4 min. Se adicionaron 20 µL de buffer TE 1X pH 7.6 (10mM Tris-Cl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0). Posteriormente, se

adicionaron 30 µL de fenol y 30 µL de cloroformo y se mezcló por inversión 10 veces. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente, se recuperó en un tubo nuevo la fase acuosa y se descartó los restos celulares.

Recuperada la fase acuosa, se precipitó el DNA con isopropanol 100 % 2 v/v por 20 min. a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó por 10 min. a 14,000 r.p.m. a 4°C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R; se descartó la fase líquida y se lavó con etanol 70% la pastilla formada. Se dejó secar el DNA en estufa a 55°C por 10 min. Por último, se resuspendió el DNA con 40 µL de buffer TE 1X pH 7.6 más 4 µl de RNAasa (10mg/ml) y se conservó a -20°C hasta su uso.

5.2.2 Método de extracción de DNA según Jin *et al.*, (2004) para hongos filamentosos

Una vez obtenido el micelio, se transfirió a tubos eppendorf de 1.5ml, se lavó con 1 ml de solución salina estéril al 0.85%, se agitó por 5 seg y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3min a 4°C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R. El micelio ya lavado, se decantó y resuspendió en 450 µl de buffer de extracción STES (0.2 M Tris-Cl pH 7.6, 0.5 M NaCl, 0.1%SDS, 0.001M EDTA pH 8.0) se agregó además 7µl de liticasa (5U/ µl). Se incubó 10 min a 37°C en un termomixer Eppendorf. Se agregó 20 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Posteriormente se agregó 100 µl de fenol y se agitó vigorosamente por 5 seg, después se agregó 100 µl de cloroformo y nuevamente se agitó por 5 seg. Se centrifugó a 14,000rpm por 10min a 4°C. Se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo. El DNA se precipitó agregando isopropanol 100% 2 v/v se incubó por 20min a -20°C. Nuevamente se centrifugó a 14,000rpm por 10min a 4°C. El sobrenadante se decantó, el DNA se lavó con 1 ml de etanol frío al 70%, se centrifugó a 14,000rpm durante 3 min a 4°C. Se dejó secar el DNA en estufa a 55°C por 10 min. Por último, se resuspendió el DNA con 40 µL de buffer TE 1X pH 7.6 más 4 µl de RNAasa (10mg/ml) y se conservó a -20°C hasta su uso.

Para ambos métodos, el DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260-280 nm en dilución 1:1000 por triplicado, asimismo la integridad se observó en gel de agarosa 1.0% en corrimiento electroforético a 80 V y 12 A utilizando una fuente de poder EC-

Apparatus Corporation en buffer TAE (0.04M Tris-Acetato, 0.001M EDTA) y la visualización se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio.

5.3 Selección de oligonucleótidos y condiciones de PCR

Se seleccionaron dos primers específicos previamente reportados (White *et al.*, 1990) para amplificar la región ITS2-5.8S ARNr, el **ITS3** 5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3' y el **ITS4** 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' sus ventajas y usos para estudios en taxonomía ya están bien descritos. Para la PCR se utilizaron 5-10 ng de ADN como templado adicionados a 50 µL de una mezcla conteniendo: 100 ng de oligonucleótidos, 10 µM de una mezcla dNTP's, 2.5 mM de MgCl₂, 10X de PCR buffer y 2.5 U de la enzima DNA *Taq-polimerasa*; un tubo con mezcla de reacción y sin templado se utilizó como control negativo. La amplificación consistió de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1.5 min, por último una extensión final de 5 min a 72°C; para llevar a cabo la amplificación se empleó un termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.).

5.4 Secuenciación y análisis de las regiones ITS2-5.8S ARNr

Los productos de la amplificación de la región ITS2-5.8S ARNr de las especies de colección de *Candida* y *Aspergillus* se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) Guanajuato, México, utilizando el kit de secuenciación BigDye Terminador v.3.1 cycle sequencing siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente en ambos sentidos utilizando los oligonucleótidos ITS3 e ITS4.

El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa Bioedit (Biological sequence alignment editor disponible en red <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron procesadas en el programa y comparadas con secuencias de referencia del Banco de Genes del Centro Nacional de Biotecnología, USA (GenBank-NCBI).

Posteriormente, todas las secuencias a excepción de la perteneciente al Centro Americano de Cultivos Tipo -ATCC- (*C. parapsilosis*), fueron reportadas en el Banco de Genes del Centro Nacional de Biotecnología, USA (GenBank-NCBI), utilizando su programa Sequin 9.20 disponible en línea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>).

5.5 Obtención *in silico* de secuencia consenso de *C. glabrata* y *A. Fumigatus*

No se contó con cultivos de colección de *C. glabrata* y *A. fumigatus* para ser utilizados como estándar de referencia, debido a lo anterior se obtuvieron cinco secuencias del GenBank (NCBI-USA) de *C. glabrata* (AY939793, AM492798, AF218966, AF218995, DQ347494) y 4 secuencias de *A. fumigatus* (DQ981399, AB369897, EF136363, AY939804) las cuales fueron analizadas *in silico* en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. (Hall TA, 1999) donde se generó una secuencia consenso para cada hongo, las cuales fueron utilizadas para los análisis subsecuentes.

5.6 Selección de sitios de corte por endonucleasas de restricción

Las secuencias de nucleótidos de la región ITS2-5.8S ARNr de las especies de colección y las consenso fueron analizadas *in silico* con el programa NEBcutter v.2.0 (New England BioLabs Inc., USA) para determinar diferentes patrones de restricción generados por los cortes con las endonucleasas de restricción (Figura 1).

5.7 RFLP

Las levaduras, por sus diferencias en tamaño y secuencias de la región ITS2-5.8S ARNr amplificada, fueron cortadas de manera específica con una enzima de restricción. Para el caso de las especies *C. rugosa*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* se utilizó *RsaI*, para *C. albicans* se utilizó *AlwI*, para *C. tropicalis* *XmaI*, para *C. lusitaniae* *XhoI* y *C. glabrata* se utilizó *AatII*.

Para cada una se realizó una reacción a un volumen total de 20 µl que contenían 10 µl de producto de PCR más 5 U de cada una de las enzimas de restricción

seleccionadas y solución amortiguadora de reacción proporcionada por el fabricante (NewEngland Biolabs, USA), por último se incubó por 12 h a 37°C a excepción de *C. glabrata* que se incubó a 30°C.

Para el caso de hongos filamentosos, las enzimas de restricción *AlwI*, *ApaI* y *AatII* (NewEngland Biolabs, USA) fueron utilizadas para digerir la región ITS2-5.8S ARNr amplificadas por PCR de las cepas de colección de *Aspergillus*. Primero los amplicones fueron digeridos con las enzimas *AlwI* y *ApaI* por 12 h a 37°C en un volumen total de 20 µl que contenían: 10 µl de producto de PCR más 5 U de cada una de las enzimas de restricción seleccionadas y solución amortiguadora de reacción (207.5 mM Tris-acetato pH 7.9, 50 mM acetato de magnesio, 330 mM acetato de potasio y 3.75 mM ditioneitol pH 7.9). Por último, se agregaron 5 U de la endonucleasa *AatII* y se incubaron por 12 h a 30°C.

5.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Todos los productos obtenidos de la reacción de restricción fueron observados en geles de poliacrilamida al 8.0% y teñidos con bromuro de etidio y se analizaron con el software LabImage 1D v.3.4.0. (Kapelan Bio-Imaging Corp., Alemania).

5.9 PCR/RFLP en aislados clínicos

Todos los aislados clínicos utilizados para la validación de la técnica de PCR/RFLP fueron proporcionados por el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control Enfermedades de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el caso de levaduras provenían en su totalidad de hemocultivos colectados hace 5 años o más, por lo cual no se contó con datos clínicos relevantes del paciente. El número de aislados clínicos analizados por cada especie de levadura fueron para el caso de *C. albicans* 23, *C. tropicalis* 13, *C. parapsilosis* 24 y *C. glabrata* 7.

En el caso de hongos filamentosos se obtuvieron a partir de cuatro muestras clínicas obtenidas de pacientes con diagnóstico presuntivo de aspergilosis, remitidos para la identificación del agente etiológico al Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La muestra

uno (C-1707) fue de una mujer de 57 años de edad, residente al norte de la zona metropolitana de Monterrey, con leucemia y aspergilosis pulmonar, ésta última tratada con anfotericina B, la paciente falleció. La muestra dos (E-1641) provino de una mujer de 35 años, del municipio de Monterrey, presentaba lupus eritematoso y aspergilosis pulmonar, ésta última tratada con anfotericina B y esteroides. La muestra tres (G-3117) provino de un hombre de 39 años, con antecedentes de tuberculosis pulmonar, presentaba un aspergiloma el cual se trató con anfotericina B e itraconazol. La muestra cuatro (G-1849) fue enviada para su identificación por el Hospital de Altas Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social por lo cual no se cuentan con datos clínicos. Las cuatro muestras de aislados clínicos fueron identificadas por características microscópicas y macroscópicas, siendo para el paciente uno *A. terreus*, para los pacientes dos y cuatro como *A. flavus*, y del paciente tres como *A. fumigatus*. Todos los resultados fueron reportados al Médico tratante y se procedió a preservar el aislado clínico en cepario de laboratorio.

Se realizó el análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr de todos los aislados clínicos como se describió anteriormente, se realizó el corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida 8.0%, se tiñó con bromuro de etidio y por último, se procedió al análisis con el software LabImage 1D v.3.4.0. (Kapelan Bio-Imaging Corp., Alemania).

5.10 Especificidad de la prueba con DNA no fúngico

Por otra parte, se realizó la amplificación con los oligonucleótidos ITS3 e ITS4, en las condiciones descritas, a aislados clínicos bacterianos identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter lwoffii*, *A. baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* así como ADN humano, se utilizó DNA de *C. albicans* y *A. flavus* de colección como control positivo.

6. RESULTADOS

6.1 Secuencias *in silico* de *C. glabrata* y *A. fumigatus*

Para la obtención de las secuencias *in silico* de *C. glabrata* y de *A. fumigatus*, se procesaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. (Hall TA, 1999) cinco secuencias previamente reportadas en el GenBank (NCBI-USA) de *C. glabrata* (AY939793, AM492798, AF218966, AF218995, DQ347494) y cuatro de *A. fumigatus* (DQ981399, AB369897, EF136363, AY939804); lo anterior con el fin de obtener secuencias consenso para analizar aislados clínicos mediante la técnica propuesta de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr. En las figuras 8 y 9, se puede observar la secuencia consenso obtenida para *C. glabrata* y *A. fumigatus* respectivamente.

6.2 Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr.

Se realizó la amplificación y secuenciación de la región ITS2-5.8S ARNr de los cultivos de colección, obteniendo productos de diferentes tamaños, para el caso de levaduras, se obtuvo de *C. rugosa* (271 pb), *C. albicans* (335 pb), *C. tropicalis* (327 pb), *C. lusitaniae* (255 pb), *C. guilliermondii* (378 pb), *C. parapsilosis* (311 pb, cepa ATCC 22019); y de hongos filamentosos *A. sydowii* (353 pb), *A. flavus* (356 pb), *A. terreus* (362 pb), *A. niger* (351 pb) y *A. nidulans* (353 pb) (Tabla 1). Todas las secuencias a excepción de la cepa ATCC (*C. parapsilosis*) fueron reportadas en el GenBank (NCBI, USA): seis secuencias de *Candida* y cinco de *Aspergillus* con los siguientes números de acceso: EU663565-EU663569 y EU796734- EU796739 (Anexo 1).

	5 15 25 35 45 55
AM492798	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGTAATGTG AATTGCAGAA TTCCGTGAAT
AF218966	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGTAATGTG AATTGCAGAA TTCCGTGAAT
AF218995	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGTAATGTG AATTGCAGAA TTCCGTGAAT
DQ347494	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGTAATGTG AATTGCAGAA TTCCGTGAAT
Consensus	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT ACGTAATGTG AATTGCAGAA TTCCGTGAAT

	65 75 85 95 105 115
AM492798	CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCT CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTTGAG
AF218966	CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCT CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTTGAG
AF218995	CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCT CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTTGAG
DQ347494	CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCT CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTTGAG
Consensus	CATCGAATCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCT CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTTTGAG

	125 135 145 155 165 175
AM492798	CGTCATTTCC TTCTCAAACA CGTTGTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTCG TTTTGTGAGT
AF218966	CGTCATTTCC TTCTCAAACA CATTTGTGTTT GGTAGTGAGT GATACTC--G TTTTGTGAGT
AF218995	CGTCATTTCC TTCTCAAACA CGTTGTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTCG TTTTGTGAGT
DQ347494	CGTCATTTCC TTCTCAAACA CGTTGTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTCG TTTTGTGAGT
Consensus	CGTCATTTCC TTCTCAAACA CRTTGTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTCG TTTTGTGAGT

	185 195 205 215 225 235
AM492798	AACTTGAAAT TGTAGGCCAT ATCAGTATGT GGGACACGAG CGCAAGCTTC TCTATTAATC
AF218966	AACTTGAAAT TGTAGGCCAT ATCAGTATGT GGGACACGAG CGCAAGCTTC TCTATTAATC
AF218995	AACTTGAAAT TGTAGGCCAT ATCAGTATGT GGGACACGAG CGCAAGCTTC TCTATTAATC
DQ347494	AACTTGAAAT TGTAGGCCAT ATCAGTATGT GGGACACGAG CGCAAGCTTC TCTATTAATC
Consensus	AACTTGAAAT TGTAGGCCAT ATCAGTATGT GGGACACGAG CGCAAGCTTC TCTATTAATC

	245 255 265 275 285 295
AM492798	TGCTGCTCGT TTGCGCGAGC GGCGGGGGTT AATACTGTAT TAGGTTTAC CAACTCGGTG
AF218966	TGCTGCTCGT TTGCGCGAGC GGCGGGGGTT AATACTGTAT TAGGTTTAC CAACTCGGTG
AF218995	TGCTGCTCGT TTGCGCGAGC GGCGGGGGTT AATACTGTAT TAGGTTTAC CAACTCGGTG
DQ347494	TGCTGCTCGT TTGCGCGAGC GGCGGGGGTT AATACTGTAT TAGGTTTAC CAACTCGGTG
Consensus	TGCTGCTCGT TTGCGCGAGC GGCGGGGGTT AATACTGTAT TAGGTTTAC CAACTCGGTG

	305 315 325 335 345 355
AM492798	TTGATCTAGG GAGGGATAAG TGAGTGTTTT GTGCGTGCTG GGCAGACAGA CGTCTTTAAG
AF218966	TTGATCTAGG GAGGGATAAG TGAGTGTTTT GTGCGTGCTG GGCAGACAGA CGTCTTTAAG
AF218995	TTGATCTAGG GAGGGATAAG TGAGTGTTTT GTGCGTGCTG GGCAGACAGA CGTCTTTAAG
DQ347494	TTGATCTAGG GAGGGATATG TGAGTGTTCT GTGCGTGCTG GGCAGACAGA CGTCTTTAAG
Consensus	TTGATCTAGG GAGGGATAWG TGAGTGTTYT GTGCGTGCTG GGCAGACAGA CGTCTTTAAG

	365 375 385 395 405 415
AM492798	TTTGACCTCA AATCAGGTAG GGTACCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGA
AF218966	TTTGACCTCA AATCAGGTAG GGTACCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGA
AF218995	TTTGACCTCA AATCAGGTAG GGTACCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGA
DQ347494	TTTGACCTCA AATCAGGTAG GGTACCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGA
Consensus	TTTGACCTCA AATCAGGTAG GGTACCCGC TGAACCTAAG CATATCAATA AGCGGA

Figura 8. Construcción de secuencia consenso de *C. glabrata* a partir de secuencias previamente reportadas en el GenBank-NCBI, USA.

	5 15 25 35 45 55
AY939804	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
DQ981399	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
EF136363	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
AB369897	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
Consensus	GCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT

	65 75 85 95 105 115
AY939804	CATCGAGTCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTCCGAG
DQ981399	CATCGAGTCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTCCGAG
EF136363	CATCGAGTCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTCCGAG
AB369897	CATCGAGTCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTCCGAG
Consensus	CATCGAGTCT TTGAACGCAC ATTGCGCCCC CTGGTATTCC GGGGGGCATG CCTGTCCGAG

	125 135 145 155 165 175
AY939804	CGTCATTGCT GCCCTCAAGC ACGGCTTGTG TGTGGGGCCC CCGTCCCCCT CTCCCGGGGG
DQ981399	CGTCATTGCT GCCCTCAAGC ACGGCTTGTG TGTGGGGCCC CCGTCCCCCT CTCCCGGGGG
EF136363	CGTCATTGCT GCCCTCAAGC ACGGCTTGTG TGTGGGGCCC CCGTCCCCCT CTCCCGGGGG
AB369897	CGTCATTGCT GCCCTCAAGC ACGGCTTGTG TGTGGGGCCC CCGTCCCCCT CTCCCGGGGG
Consensus	CGTCATTGCT GCCCTCAAGC ACGGCTTGTG TGTGGGGCCC CCGTCCCCCT CTCCCGGGGG

	185 195 205 215 225 235
AY939804	ACGGGCCCGA AAGGCAGCGG CGGCACCGCG TCCGGTCCTC GAGCGTATGG GGCTTTGTCA
DQ981399	ACGGGCCCGA AAGGCAGCGG CGGCACCGCG TCCGGTCCTC GAGCGTATGG GGCTTTGTCA
EF136363	ACGGGCCCGA AAGGCAGCGG CGGCACCGCG TCCGGTCCTC GAGCGTATGG GGCTTTGTCA
AB369897	ACGGGCCCGA AAGGCAGCGG CGGCACCGCG TCCGGTCCTC GAGCGTATGG GGCTTTGTCA
Consensus	ACGGGCCCGA AAGGCAGCGG CGGCACCGCG TCCGGTCCTC GAGCGTATGG GGCTTTGTCA

	245 255 265 275 285 295
AY939804	CCTGCTCTGT AGGCCCCGGC GGCGCCAGCC GACACCCAAC TTTATTTTTC TAAGGTTGAC
DQ981399	CCTGCTCTGT AGGCCCCGGC GGCGCCAGCC GACACCCAAC TTTATTTTTC TAAGGTTGAC
EF136363	CCTGCTCTGT AGGCCCCGGC GGCGCCAGCC GACACCCAAC TTTATTTTTC TAAGGTTGAC
AB369897	CCTGCTCTGT AGGCCCCGGC GGCGCCAGCC GACACCCAAC TTTATTTTTC TAAGGTTGAC
Consensus	CCTGCTCTGT AGGCCCCGGC GGCGCCAGCC GACACCCAAC TTTATTTTTC TAAGGTTGAC

	305 315 325 335 345
AY939804	CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA GGA
DQ981399	CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA GGA
EF136363	CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA GGA
AB369897	CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA GGA
Consensus	CTCGGATCAG GTAGGGATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA GGA

Figura 9. Construcción de secuencia consenso de *A. fumigatus* a partir de secuencias previamente reportadas en el GenBank-NCBI, USA.

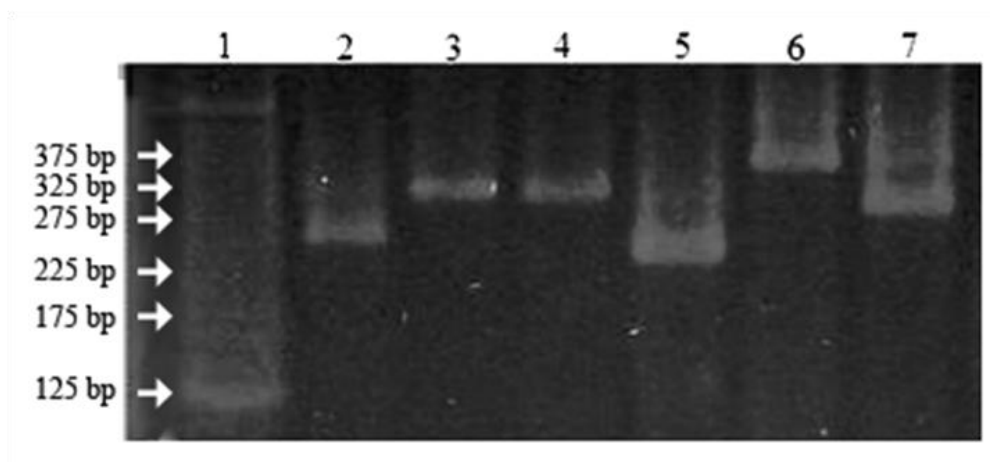
TABLA I

Cepas de colección utilizadas en el presente estudio. Se incluye el número de acceso al GenBank, el tamaño de la región ITS2-5.8S y parcial 28S del gen ARNr, las enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos por corte con ellas.

Hongo	No. acceso GenBank	Region ITS, 5.8S y secuencia parcial 28S de ARNr (nt)	Enzima de restricción seleccionada	Fragmentos longitudinales de restricción obtenidos(nt)	No. de aislados clínicos identificados
<i>C. rugosa</i>	EU663569	271	<i>RsaI</i>	234, 37	0
<i>C. albicans</i>	EU663565	335	<i>AlwI</i>	208, 127	23
<i>C. tropicalis</i>	EU796734	327	<i>XmaI</i>	186, 141	13
<i>C. lusitaniae</i>	EU663568	255	<i>XhoI</i>	159, 84, 12	0
<i>C. guilliermondii</i>	EU663566	378	<i>RsaI</i>	210, 168	0
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	311	<i>RsaI</i>	228, 83	24
<i>C. glabrata</i>	N.D.	416	<i>AatII</i>	353, 63	7
<i>A. sydowii</i>	EU796737	353	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	184, 90	0
<i>A. flavus</i>	EU796739	356	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	188, 106	2
<i>A. terreus</i>	EU796736	362	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	159, 133	1
<i>A. niger</i>	EU796735	351	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	184, 105	0
<i>A. nidulans</i>	EU796738	353	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	183, 129	0
<i>A. fumigates</i>	N.D.	353	<i>ApaI, AlwI, AatII</i>	160, 130	1

nt: nucleótidos, N.D.: no disponible

Asimismo, en base a las amplificaciones por PCR de las especies del género *Candida* en ejemplares de colección, encontramos que es posible solo con esta técnica determinar diferencias entre las seis especies utilizando la región ITS2-5.8S ARNr al ser observadas en gel de poliacrilamida al 8.0%, ya que presenta bandas con tamaños oscilando entre los 250-380 pb (Figura 10) según corresponda.



- **Figura 10. Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr.** Amplificación por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0% de especies de colección del género *Candida*. Carril: 1) Marcador de 25 pb, 2) *Candida rugosa* (271 pb), 3) *C. albicans* (335 pb), 4) *C. tropicalis* (327 pb), 5) *C. lusitaniae* (255 pb), 6) *C. guilliermondii* (378 pb), 7) *C. parapsilosis* (311 pb).

Por otra parte, al analizar los productos de la amplificación de la región ribosomal utilizada en el presente estudio pero en las especies del género *Aspergillus* de ejemplares de colección, no se observó diferencia significativa entre los productos amplificados ya que oscilaron en bandas aproximadas a los 350 pb (Figura 11).

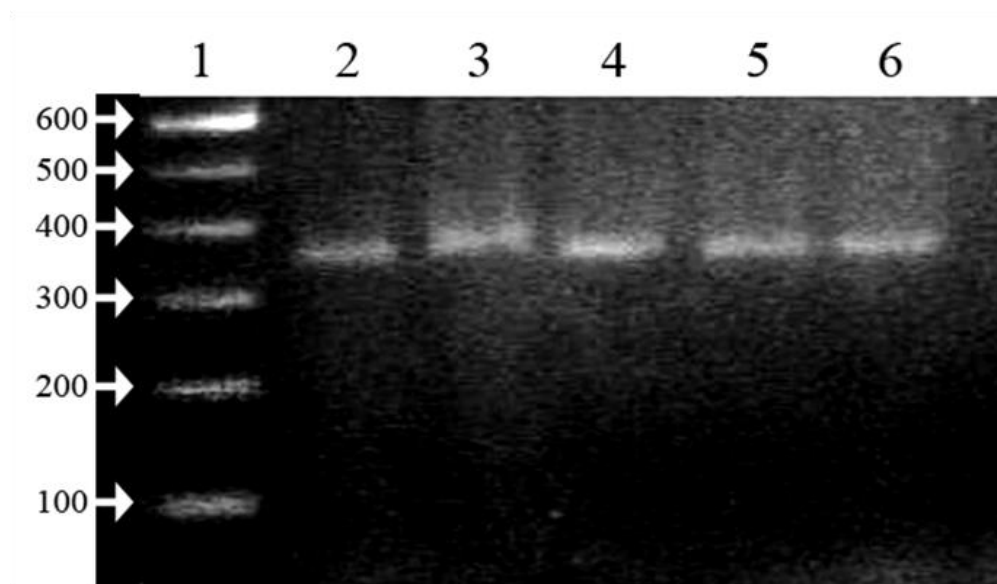


Figura 11. Análisis por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr. Amplificación por PCR de la región ITS2-5.8S ARNr en PAGE 8.0% de especies de colección del género *Aspergillus*. Carril: 1) Marcador de 100 pb, 2) *A. sydowii* (353), 3) *A. flavus* (356), 4) *A. terreus* (362), 5) *A. niger* (351), 6) *A. nidulans* (353).

6.3 Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*

En base al análisis de las secuencias de los cultivos de colección y las consenso obtenidas *in silico*, se establecieron diferentes enzimas de restricción para distinguir los polimorfismos de la región entre las especies como se indica en la Figuras 12 y 13, en la primera se esquematizan los cortes a realizar con la endonucleasa de restricción para las especies del género *Candida*; y en la siguiente para las especies del género *Aspergillus* respectivamente.

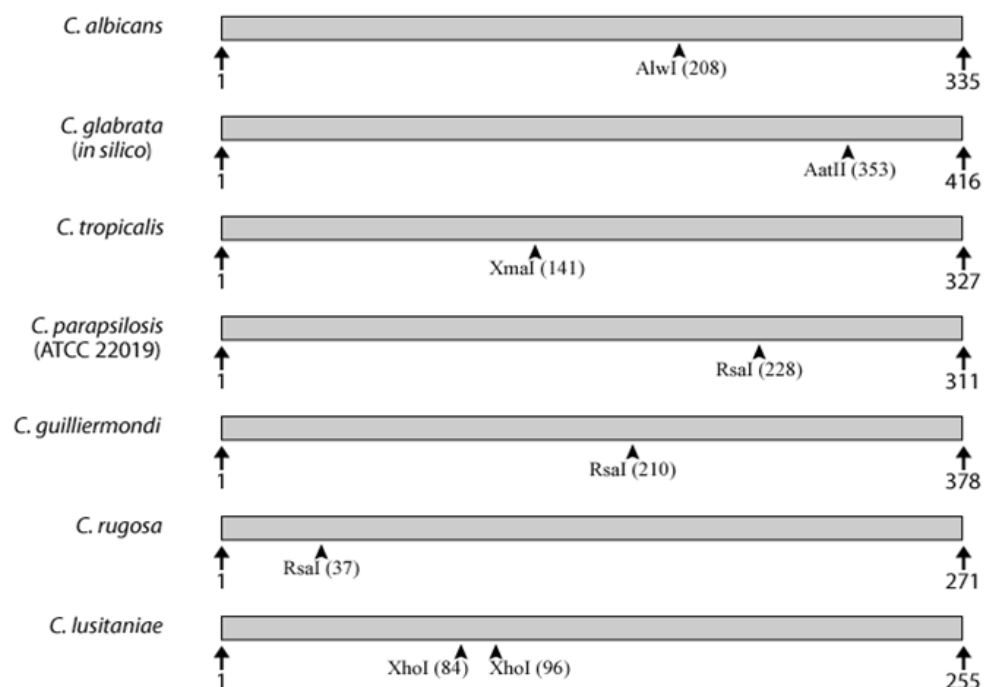


Figura 12. Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de *Candida* spp. Esquematación del análisis *in silico* de los polimorfismos de restricción para las especies del género *Candida*. Se puede observar para cada especie, el sitio de corte de cada una de las enzimas de restricción así como la longitud total del fragmento por analizar.

El análisis por RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr de los cultivos de colección de *Candida* y *Aspergillus* y su posterior evaluación mediante el programa LabImage 1D v.3.4.0. (Kapelan Bio-Imaging Corp., Alemania) determinó que los productos obtenidos poseían los patrones de restricción esperados en cada uno de ellos, para el caso de las levadura (Figura 14): *C. rugosa* (234, 37 pb), *C. albicans* (208, 127 pb), *C. tropicalis* (186, 141 pb), *C. lusitaniae* (159, 84, 12 pb), *C. guilliermondii* (210, 168 pb), *C. parapsilosis* (228, 83 pb); así como para los hongos filamentosos (Figura 15) *A. flavus* (188, 106 pb), *A. niger* (184, 105 pb), *A. nidulans* (183 y 129 pb), *A. sydowii* (184, 90 pb) y *A. terreus* (159, 133 pb).

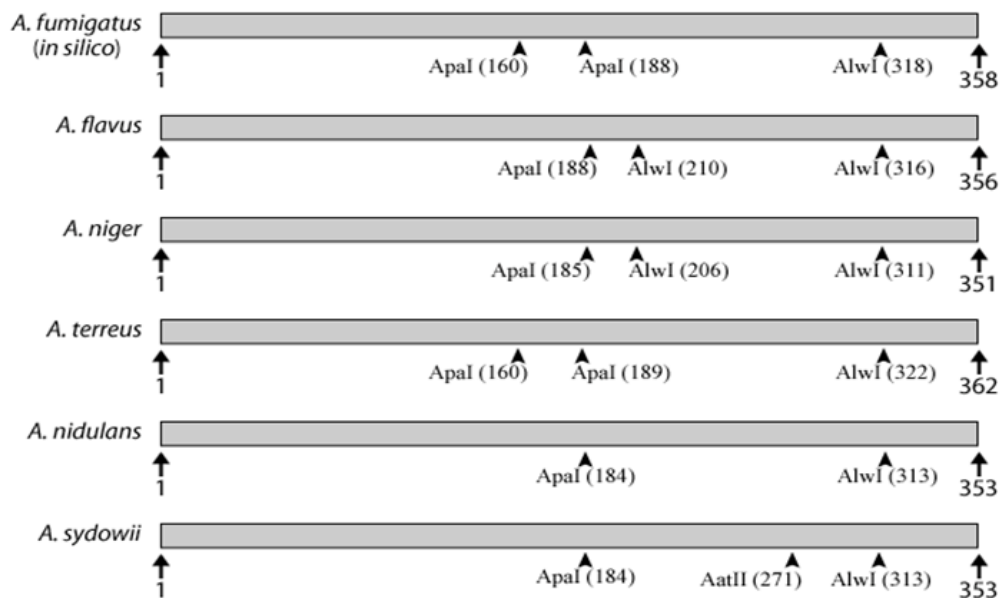


Figura 13. Análisis de PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S de *Aspergillus* spp. Esquematización del análisis *in silico* de los polimorfismos de restricción para las especies del género *Aspergillus*. Se puede observar para cada especie, el sitio de corte de cada una de las enzimas de restricción así como la longitud total del fragmento por analizar.

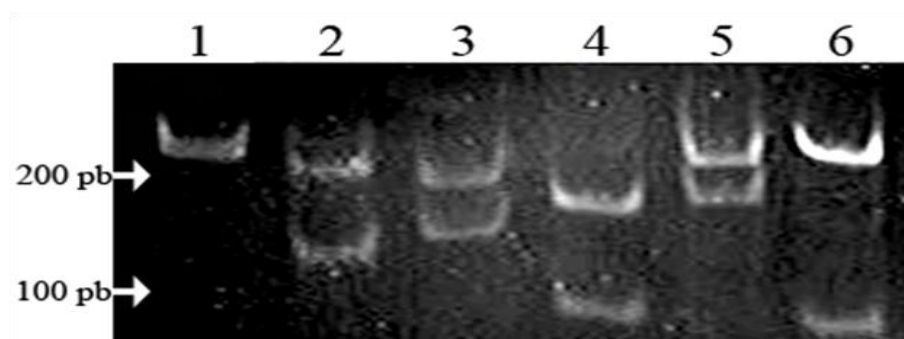


Figura 14. Caracterización por PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S del ARN ribosomal de especies de importancia clínica del género *Candida*. PAGE 8.0%, carriles 1) *C. rugosa* + *RsaI* (234 pb), 2) *C. albicans* + *AlwI* (208 y 127 pb), 3) *C. tropicalis* + *XmaI* (186 y 141 pb), 4) *C. lusitanae* + *XhoI* (159 y 84 pb), 5) *C. guilliermondii* + *RsaI* (210 y 168 pb) y 6) *C. parapsilosis* + *RsaI* (228 y 83 pb).

Con lo anterior, se observó que solo utilizando la enzima *AlwI* se puede diferenciar entre especie *albicans* (335 pb) de todas las no *albicans*, al ser esta enzima específica para el producto de la amplificación, lo anterior es importante considerando que en un corrimiento electroforético podría fácilmente confundirse con el patrón de bandas de *C. tropicalis* (327 pb).

Asimismo, se encontró un sitio conservado para la enzima *RsaI* que diferencia las especies *C. rugosa*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*; que aunque el producto de la amplificación de la región ITS2-5.8S ARNr es muy diferente en tamaño entre ellos (271, 378 y 311) es importante por la especificidad que muestra el patrón de bandas de la RFLP.

Por otra parte, se observó que aunque no se contó con cepa de colección para *C. glabrata*, ésta presenta una amplificación de la región ribosomal de un tamaño mayor (416 pb) en comparación con el resto de las especies, esto es de gran valor, considerando que entre las especie estudiadas esta es la que presenta una resistencia intrínseca a los compuestos azólicos, por lo cual, fue de utilidad establecer el patrón de bandas de RFLP con la enzima única *AatII* para esta especie.

Por otra parte, para los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, se observó un alto grado de conservación de la región ITS2-5.8S ARNr entre las seis especies analizadas, con un rango de tamaño de la amplificación de entre 351 a 362; sin embargo, este mismo grado de similitud facilitó para el uso de una mezcla de enzimas de restricción para establecer el patrón de polimorfismos por fragmentos de restricción, aplicando las enzimas *ApaI*, *AlwI* y *AatII* en una solución buffer establecida por nosotros con la cual se logró cubrir los requerimientos químicos para la función de las tres enzimas.

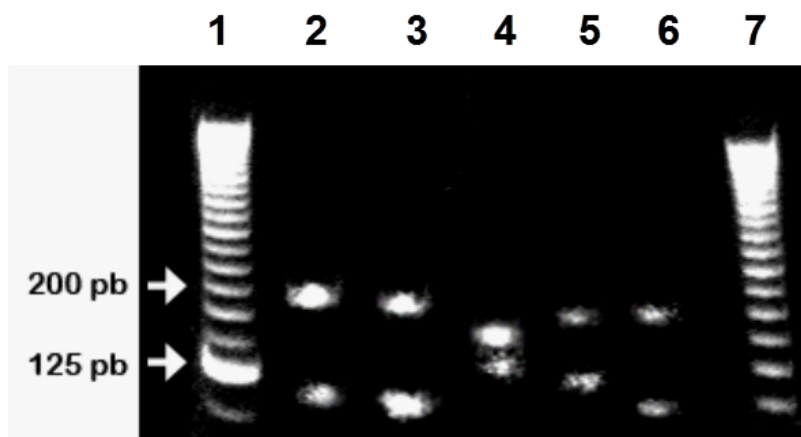


Figura 15. Caracterización por PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S del ARN ribosomal de especies de importancia clínica del género *Aspergillus*. PAGE 8.0% y digeridas con las enzimas de restricción *AlwI*, *Apal* and *AatII*. carriles 1) Marcador de 25 pb, 2) *A. flavus* (188 y 106 pb), 3) *A. niger* (184 y 105 pb), 4) *A. terreus* (159 y 133 pb), 5) *A. nidulans* (183 y 129 pb) y 6) *A. sydowii* (184 y 90 pb).

Se obtuvieron patrones de bandas en gel de poliacrilamida al 8.0% que en base a un marcador de peso molecular de 25 pb y con uso del software LabImage 1D v.3.4.0. (Kapelan Bio-Imaging Corp., Germany) se distinguieron entre ellas. Lo anterior se hace mención ya que al obtener el análisis *in silico* se observó la cercanía entre las bandas por obtener, sin embargo, la sensibilidad del marcador sirvió para lograr diferenciarlas.

6.4 Análisis por PCR/RFLP en aislados clínicos

Los 67 aislados clínicos provenientes de hemocultivos de especies del género *Candida* no mostraron diferencia en su identificación al comparar el sistema API 20C AUX con nuestro ensayo molecular mediante PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr, este último se obtuvo al observar los fragmentos de restricción en gel de poliacrilamida 8.0% y analizarlos mediante un programa computacional para geles de una dimensión.

Para el caso de la especie *C. albicans* en los 23 aislados se observaron fragmentos de 208 y 127 pb (Figura 16), para las 13 *C. tropicalis* fragmentos de 186 y 141 pb (Figura 17), en las 24 *C. parapsilosis* de 228 y 83 pb (Figura 18) y 7 *C. glabrata* 353 y 63 pb (Figura 19).

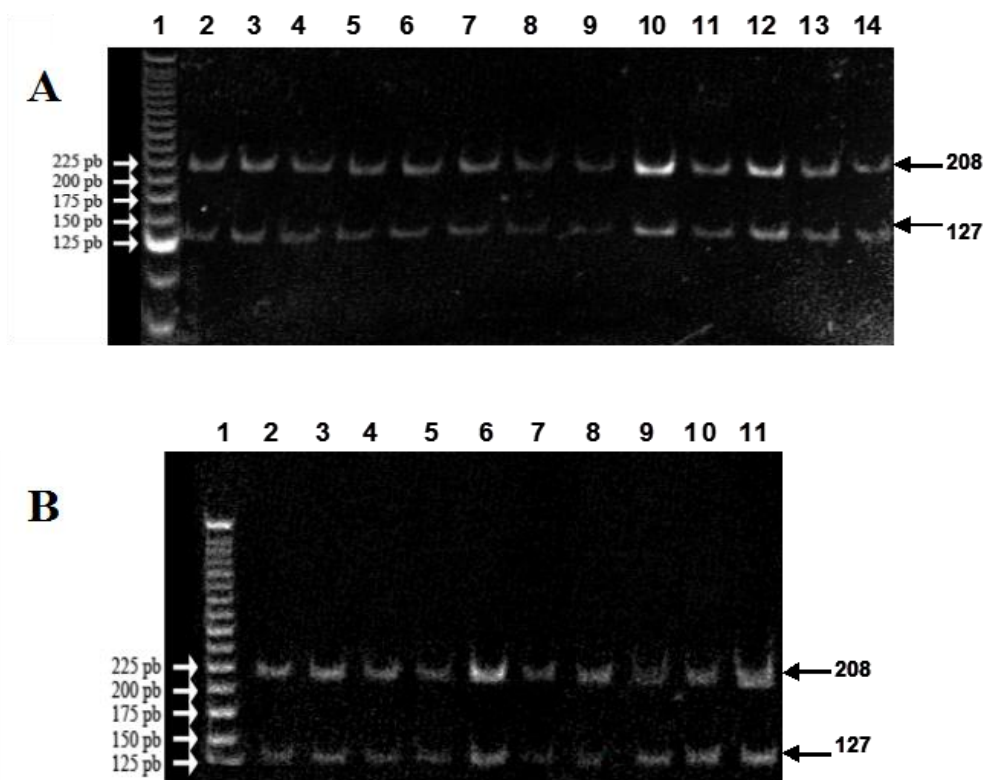


Figura 16. Caracterización por PCR/RFLP de 23 aislados clínicos de *C. albicans* de la región ITS2-5.8S ARNr. A. 13 aislados de *C. albicans*. B. 10 aislados de *C. albicans* en donde se observan bandas de 208 y 127 pb en PAGE al 8.0%

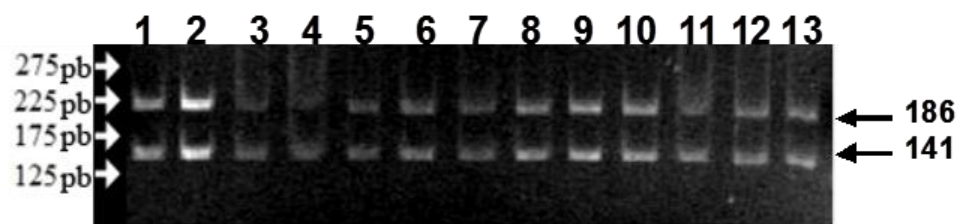


Figura 17. Caracterización por PCR/RFLP de 13 aislados clínicos de *C. tropicalis* de la región ITS2-5.8S ARNr. Se observan bandas de 186 y 141 pb en PAGE al 8.0%.

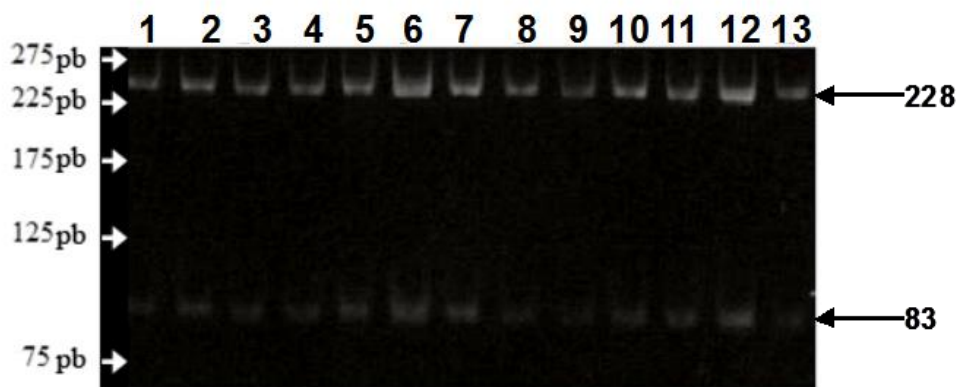
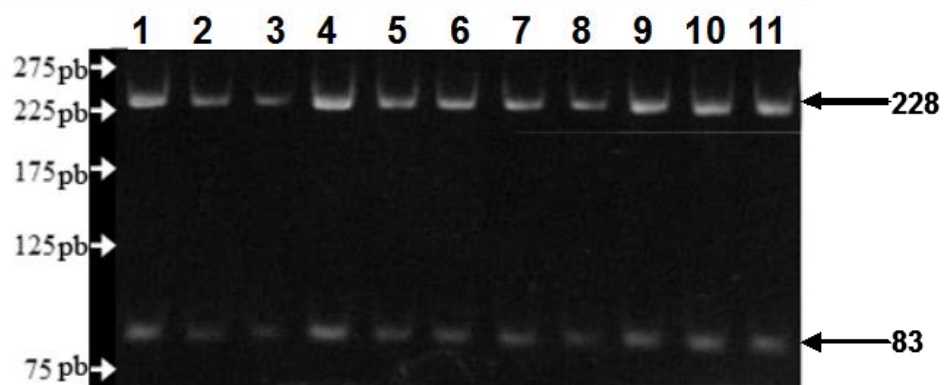


Figura 18. Caracterización de 24 aislados clínicos de *C. parapsiiosis* identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr. Se observan las bandas de 228 y 83 pb en PAGE al 8.0%.

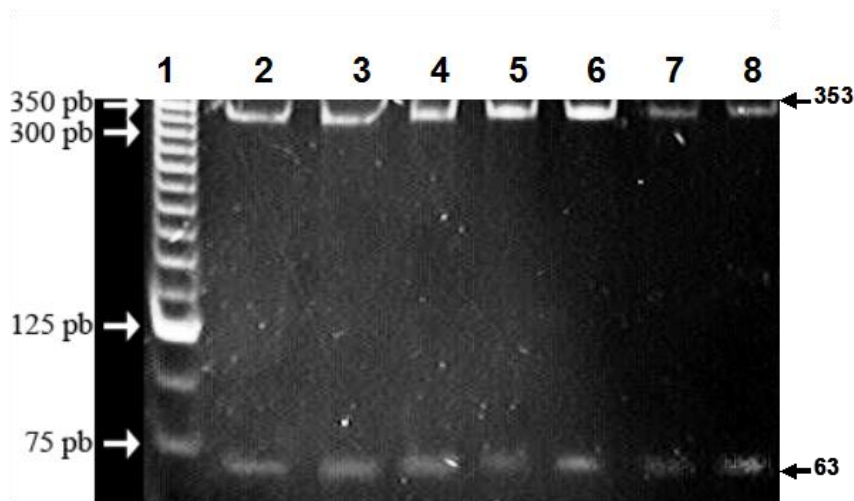


Figura 19. Caracterización de 7 aislados clínicos de *C. glabrata* identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr. Se observan las bandas de 353 y 63 pb en PAGE 8.0%.

Los aislados clínicos de hongos filamentosos correspondientes a las muestras E-1641 y G-1849, produjeron un patrón de bandas observados en gel de poliacrilamida 8.0% (Figura 20), correspondiendo en su patrón de restricción a los esperados para *A. flavus* (188 y 106). Para el aislado de la muestra G-3117 identificado como *A. fumigatus*, se determinó al compararla con los análisis *in silico* de la secuencia consenso utilizada para esta especie que era a la que correspondía al observar un patrón de fragmentos bien definido de 159 y 130 pb. Por último, cuando se comparó el producto de PCR de la muestra C-1707 con la secuencia estándar se observó que; al hacer el análisis de restricción se producen dos fragmentos de 159 y 133 pb, con lo cual se le identificó como *A. terreus*, según el patrón presentado (Figura 20), asimismo, dicha muestra coincidió con la identificación por morfología microscópica y macroscópica.

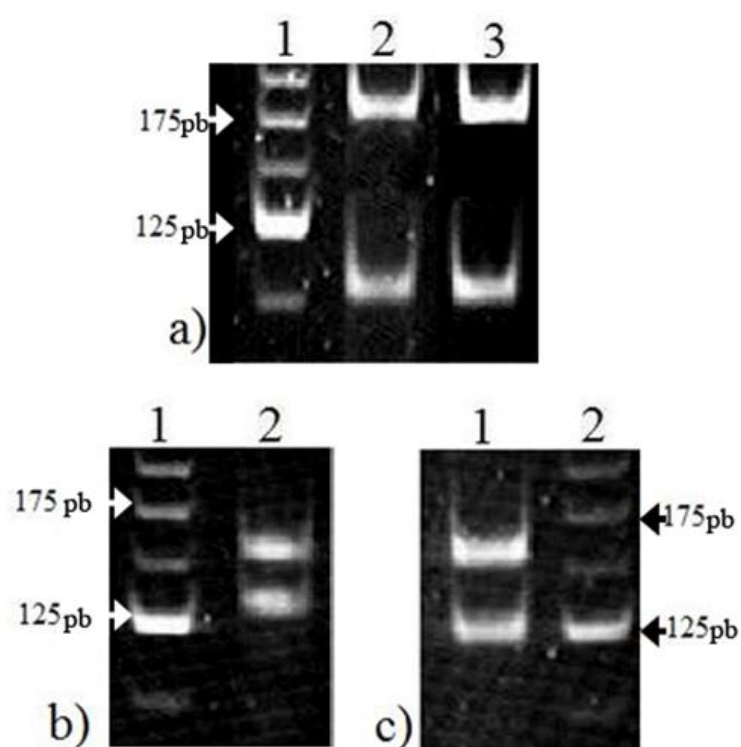


Figura 20. Caracterización de 4 aislados clínicos de *Aspergillus* identificados por la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr. a) *A. flavus* en carriles 2 y 3 mostrando 2 bandas de 188 y 106 pb, b) *A. terreus* en el carril 2 mostrando bandas de 159 y 133 pb y c) *A. fumigatus* mostrando en el carril 1 bandas de 159 y 130 pb en PAGE al 8.0%

6.5 Comparación del método tradicional contra PCR/RFLP de ITS2-5.8s ARNr

Como se puede observar en la Tabla 2, los resultados obtenidos tanto para *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, mostraron que al menos para las especies aquí estudiadas y considerando solamente la especificidad de las pruebas, no hay una diferencia entre el empleo de métodos convencionales de identificación en comparación con el uso de la PCR/RFLP de las región ITS2-5.8S ARNr aquí propuesto.

TABLA II

Comparación del método de identificación convencional de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* con la PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S ARNr.

Especie	N	Métodos	PCR/RFLP ITS2-
		convencionales*	5.8S ARNr
<i>C. albicans</i>	23	23	23
<i>C. tropicalis</i>	13	13	13
<i>C. parapsilosis</i>	24	24	24
<i>C. glabrata</i>	7	7	7
<i>A. flavus</i>	2	2	2
<i>A. terreus</i>	1	1	1
<i>A. fumigatus</i>	1	1	1

*Levaduras: API 20C AUX

*Mohos: Morfología macro y microscópica

6.6 Análisis en aislados clínicos bacteriológicos y humano

La mayoría de las secuencias de las regiones ITS que codifican para los genes de ARN ribosomal se encuentran altamente conservadas en el Reino Fungi, pero existen áreas en estas regiones con variabilidad que generan secuencias específicas de especie, esto ha permitido que estas sean utilizadas para la identificación taxonómica a partir de técnicas en biología molecular. Lo anterior se menciona ya que al realizar la PCR con los primers ITS3 e ITS4 en las bacterias de importancia médica clínica *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter lwoffii*, *A. baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* así como en ADN humano no se obtuvo amplificación, a diferencia del control positivo *A. flavus* de colección donde se observó un fragmento de aproximadamente 350 pb.

7. DISCUSIÓN

Establecimos una técnica de PCR/RFLP diseñada específicamente para la identificación de las especies más frecuentemente reportadas en infecciones fúngicas. Está basada en la amplificación de la región ITS2-5.8S de ARN ribosomal multicopias acoplada a la restricción enzimática específica de este fragmento. Varios métodos para la identificación de especies fúngicas están basados en la variabilidad de la región ribosomal ITS2, la cual está flanqueada por secuencias conservadas del gen de ARN ribosomal (Ayatollahi Mousavi *et al.*, 2012 ;Chen *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2000; Trost *et al.*, 2004; Turenne *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001).

El método permite la identificación de las especies más relevantes clínicamente de los géneros *Candida* y *Aspergillus*. La habilidad para identificar patógenos fúngicos es esencial en relación a las diferencias en la susceptibilidad entre especies del mismo género a los agentes antifúngicos convencionales. La técnica fue capaz de diferenciar entre siete especies clínicamente importantes de *Candida* y seis especies del género *Aspergillus*. Una limitante del análisis de longitud de fragmentos por PCR del ITS2-5.8S de ARNr es la poca variación de los tamaños de los fragmentos entre ciertas especies como *C. albicans* y *C. tropicalis*, pero tienen diferencias en la secuencia, representadas en los sitios de restricción que fueron usados para diferenciarlas. El sitio *AlwI* se mostró conservado en 23 aislamientos clínicos previamente identificados como *C. albicans* por técnicas microbiológicas así como el sitio *XmaI*, presente en 13 aislamientos reportados como *C. tropicalis*. Ciertamente se han reportado variaciones intra-especie de las secuencias ITS2 (Fujita *et al.*, 2001) en aislamientos clínicos pero en este caso no tuvimos ningún aislamiento microbiológicamente identificado con un sitio perdido.

En general, con esta técnica pueden identificarse polimorfismos de los fragmentos de restricción de los productos de PCR que están presentes en las secuencias ribosomales en ciertas especies de *Candida* y *Aspergillus*. Esto representa una contribución significativa para el manejo de pacientes con enfermedades causadas por estos hongos. Se ha reportado que la identificación precisa de la especie del agente etiológico es esencial, puesto que determina el tipo, dosis y duración de la terapia antimicótica, proporcionando a la vez información para la vigilancia epidemiológica (Bagg *et al.*, 2003; Flückiger *et al.*, 2006; Rickerts *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2001).

En contraste, el PCR anidado es considerado una técnica altamente específica para la amplificación de fragmentos de ADN, puesto que implica dos reacciones donde el primer templado está basado en el ADN genómico y el producto de la primer reacción es usado como un templado para la segunda reacción. Una aproximación de la amplificación del gen de la ADN topoisomerasa II (Kanbe *et al.*, 2003) para la identificación de especies de *Candida* y *Aspergillus* probó ser capaz de diferenciar cinco especies de la levadura y una de *Aspergillus*, *A. fumigatus*. Debido a que es esencial reconocer al agente causal de las aspergilosis para el tratamiento correcto, se convierte en una técnica limitada.

La PCR tiempo real es una técnica con un alto grado de sensibilidad. Fue usada para identificar *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* en pacientes con fungemia, detectando en 10 fg de DNA purificado en ambas especies; sin embargo, su uso con otras especies clínicamente importantes no ha sido reportado (Pryce *et al.* 2003).

Esta estrategia fue capaz de detectar con éxito todas las cepas de referencia y también todas los 67 aislados de *Candida*: 24 fueron identificados como *C. parapsilosis lato sensu*, 23 como *C. albicans*, 13 como *C. tropicalis* y 7 como *C. glabrata*.

Aunque *C. albicans* es la causa más frecuente de la enfermedad fúngica invasiva y que además también juega un papel importante en la morbilidad y mortalidad de los pacientes comprometidos (de Aguirre *et al.*, 2004; Mirhendi *et al.*, 2005, Ayatollahi

Mousavi y otros, 2012), nuestro estudio mostró que *C. parapsilosis* (24/67) fue la especie más frecuentemente aislados de las muestras clínicas incluidas en este estudio. Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los mostrados por Clark et al, 2004, en la *C. parapsilosis* fue una importante causa de un brote de infecciones del torrente sanguíneo que se presentaron en un hospital comunitario, la causa fue multifactorial y se relacionó a que los pacientes presentaban catéteres intravasculares durante su hospitalización en la Unidad de Cuidados Intensivos por un tiempo prolongado.

Aunque la interpretación de resultados de técnicas como RFLP y el análisis de marcadores de microsatélites polimórficos son considerados arduos, han sido establecidos como las técnicas más adecuadas para la identificación de especies clínicamente importantes (Bart-Delabesse *et al.*, 2001; Lasker 2002). La combinación de PCR con RLP resulta en una técnica simple, barata y rápida que puede ayudar a la identificación de levaduras clínicamente importantes, que es la razón por la cual se ha usado para especies de *Candida* (Pinto *et al.*, 2004; Trost *et al.*, 2004).

En este estudio, proponemos una alternativa al método para identificar especies de *Candida* y *Aspergillus* por análisis PCR/RFLP de la región ITS2-5.8S *ARNr*. Probamos su eficiencia en la identificación de sesenta y siete levaduras y cuatro hongos filamentosos de aislamientos clínicos. Proponemos la técnica como una herramienta rápida que puede ser usada como un soporte para los métodos de identificación tradicionales en el laboratorio clínico debido a su relevancia en la identificación de las especies de los agentes etiológicos para establecer el tratamiento del paciente. También es importante indicar que cuando se usa con DNA bacteriano y humano, la amplificación no ocurre, demostrando así su alta especificidad.

8. CONCLUSIONES

- Diseñamos una estrategia combinando la técnica de PCR y la RFLP basada en la amplificación de la región ITS2-5.8 de ARN ribosomal para diferenciar las especies de *Candida* y *Aspergillus* de importancia clínica.
- Logramos establecer por medio de esta técnica una alta especificidad para la identificación de *Candida* y *Aspergillus*, ya que fuimos capaces de tener el 100% de relación entre los resultados obtenidos por métodos microbiológicos convencionales y los moleculares.
- La estrategia de la PCR / RFLP que utilizamos posee una alta especificidad en demostrar a los hongos patogénicos ya que es capaz de discriminar la presencia de ADN de bacterias y del humano.
- Fuimos capaces de identificar las 67 levaduras y de los 4 *Aspergillus* en menos de 24 horas en comparación con las 72 horas que se tarda una identificación por métodos microbiológicos.
- Todo esto redundará en una rápida identificación del agente etiológico de la micosis que en pacientes con compromiso inmunológico son de tipo invasivo, a un diagnóstico más rápido y temprano y por ende a poder iniciar la terapia antifúngica temprana, ya que esto nos llevará a reducir la alta mortalidad en este tipo de pacientes.
- Reportamos 11 secuencias al banco de genes internacional: 6 *Candida* y 5 *Aspergillus* con los siguientes No de acceso: EU663565-EU663569 y EU796734-EU796739.

APÉNDICES

Apéndice I.- Secuencias reportadas en el GenBank del Centro Nacional de Información en Biotecnología, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)

LOCUS EU796739 356 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Aspergillus flavus* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796739
 VERSION EU796739.1 GI:193245494
 KEYWORDS .
 SOURCE *Aspergillus flavus*
 ORGANISM *Aspergillus flavus*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Aspergillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 356)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Use of ribosomal sequence PCR/RFLP for the identification of
Aspergillus spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 356)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..356
 /organism="*Aspergillus flavus*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="bronchial lavage fluid from
 aspergilosis patient in University Hospital, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey"
 /db_xref="taxon:5059"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA <1..>356
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aactagtgtg aattgcagaa ttccgtgaat
 61 catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggtattcc ggggggcatg cctgtccgag
 121 cgtcattgct gccatcaag cacggcttgt gtgttgggtc gtcgtcccct cttcgggggg
 181 gacgggcccc aaaggcagcg gcggcaccgc gtccgatact cgagcgtatg gggctttgtc
 241 acccgctctg taggcccggc cggcgcttgc cgaacgcaaa acaaccattc tttccaggtt
 301 gacctcggat caggtaggga taccgcgtga acttaagcat atcaataagc ggagga

LOCUS EU796738 353 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Emericella nidulans* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796738
 VERSION EU796738.1 GI:193245493
 KEYWORDS .
 SOURCE *Emericella nidulans* (anamorph: *Aspergillus nidulans*)
 ORGANISM *Emericella nidulans*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae;
Emericella.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 353)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Use of ribosomal sequence PCR/RFLP for the identification of
Aspergillus spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 353)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..353
 /organism="*Emericella nidulans*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="bronchial secretion from aspergilosis
 patient in University Hospital, Universidad Autonoma de
 Nuevo Leon, Monterrey"
 /db_xref="taxon:162425"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA <1..>353
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcacgcatga agaacgcagc gaactgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat
 61 catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggcattcc ggggggcatg cctgtccgag
 121 cgtcattgct gccctcaagc ccggcttggtg tgttgggtcg tcgtccccc cgggggacgg
 181 gcccgaaagg cagcggcggc accgtgtccg gtcctcgagc gtatggggct ttgtcacccg
 241 ctcgattagg gccggccggg gcgcagccgg cgtctccaac cttatttttc tcaggttgac
 301 ctcgatcag gtagggatac ccgctgaact taagcatatc aataagcgga gga
 //

LOCUS EU796737 353 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Aspergillus sydowii* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796737
 VERSION EU796737.1 GI:193245492
 KEYWORDS .
 SOURCE *Aspergillus sydowii*
 ORGANISM *Aspergillus sydowii*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Aspergillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 353)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Use of ribosomal sequence PCR/RFLP for the identification of
Aspergillus spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 353)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..353
 /organism="*Aspergillus sydowii*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="bronchial lavage fluid from
 aspergilosis patient in University Hospital, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey"
 /db_xref="taxon:75750"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA <1..>353
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaactgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat
 61 catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggcattcc ggggggcatg cctgtccgag
 121 cgtcattgct gccatcaag cccggcttgt gtgttgggtc gtcgtcccc ccgggggacg
 181 ggcccgaaag gcagcggcgg caccgtgtcc ggtcctcgag cgtatggggc ttgtgcaccc
 241 gctcgactag ggccggccgg gcgcagccg acgtctcaa ccatttttct tcagggttgac
 301 ctcgatcag gtagggatac ccgctgaact taagcatatc aataagcgga gga
 //

LOCUS EU796736 362 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Aspergillus terreus* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796736
 VERSION EU796736.1 GI:193245491
 KEYWORDS .
 SOURCE *Aspergillus terreus*
 ORGANISM *Aspergillus terreus*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae;
 mitosporic Trichocomaceae; *Aspergillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 362)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Use of ribosomal sequence PCR/RFLP for the identification of
Aspergillus spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 362)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..362
 /organism="*Aspergillus terreus*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="bronchial lavage fluid from
 aspergillosis patient in University Hospital, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey"
 /db_xref="taxon:33178"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA <1..>362
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aactaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat
 61 catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc ctggtattcc ggggggcatg cctgtccgag
 121 cgtcattgct gccctcaagc ccggcttggtg tgttgggccc tcgtcccccg gctcccgggg
 181 gacgggcccc aaaggcagcg gcggcaccgc gtccggtcct cgagcgtatg gggcttcgtc
 241 ttccgctccg tagggccggc cggcgccgc cgacgcattt attgcaact tgtttttttc
 301 caggttgacc tcggatcagg tagggatacc cgctgaactt aagcatatca ataagcggag
 361 ga

//

LOCUS EU796735 351 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Aspergillus niger* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796735
 VERSION EU796735.1 GI:193245490
 KEYWORDS .
 SOURCE *Aspergillus niger*
 ORGANISM *Aspergillus niger*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae; *Aspergillus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 351)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Use of ribosomal sequence PCR/RFLP for the identification of *Aspergillus* spp.
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 351)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..351
 /organism="*Aspergillus niger*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="bronchioalveolar lavage fluid from aspergilosis patient in University Hospital, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey"
 /db_xref="taxon:5061"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA
 <1..>351
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga acgcagcgaa atgcgataac taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat
 61 cgagtctttg aacgcacatt gcgccccctg gtattccggg gggcatgcct gtccgagcgt
 121 cattgtctgcc ctcaagcccg gcttgtgtgt tgggtcgccg tccccctctc cggggggacg
 181 ggcccgaag gcagcggcgg caccgcgtcc gatcctcgag cgtatggggc ttgtcacat
 241 gctctgtagg attggccggc gcctgccgac gttttccaac cattctttcc aggttgacct
 301 cggatcaggt agggataccc gctgaactta agcatatcaa taagcggagg a
 //

LOCUS EU796734 327 bp DNA linear PLN 05-JUL-2008
 DEFINITION *Candida tropicalis* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796734
 VERSION EU796734.1 GI:193245489
 KEYWORDS .
 SOURCE *Candida tropicalis*
 ORGANISM *Candida tropicalis*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
 Candida.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 327)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of *Candida* species in blood clinical samples by
 restriction fragment length polymorphism of polymerase chain
 reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 327)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-JUN-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..327
 /organism="*Candida tropicalis*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="hemoculture of blood from patient in
 University Hospital, Universidad Autonoma de Nuevo Leon,
 Monterrey"
 /db_xref="taxon:5482"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano G."
 misc_RNA <1..>327
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat acgtaatatg aattgcagat attcgtgaat
 61 catcgaatct ttgaacgcac attgcgccct ttggtattcc aaagggcatg cctgtttgag
 121 cgtcatttct cctcaaacc cccgggtttg gtgttgagca atacgctagg ttgttttgaa
 181 agaatttaac gtggaaaactt attttaagcg acttaggttt atccaaaacg cttattttgc
 241 tagtggccac cacaatttat ttcataactt tgacctcaa tcaggtagga ctacccgctg
 301 aacttaagca tatcaataag cggagga
 //

LOCUS EU663569 274 bp DNA linear PLN 17-MAY-2008
 DEFINITION *Candida rugosa* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU663569
 VERSION EU663569.1 GI:187940506
 KEYWORDS .
 SOURCE *Candida rugosa*
 ORGANISM *Candida rugosa*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; *Candida*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 274)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of *Candida* species in blood clinical samples by restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 274)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-APR-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..274
 /organism="Candida rugosa"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="blood"
 /db_xref="taxon:5481"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano, G."
 misc_RNA
 <1..>274
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat acgtagtacg aaacgcagtc gtgatcatcg
 61 aatctttgaa cgcacattgc gcagtgcggc attccgcaca gcatgcctgt ttgagcaata
 121 tttctctctc gcaaggtggt gggcaccacg ccggcaggcg tctgtccgaa acgcagccgt
 181 ccaaaacagt taagcttggt acggaccctt tgacgttatt ctcaaatacag gtaggactac
 241 ccgctgaact taagcatatc aataagcgga ggaa
 //

LOCUS EU663568 256 bp DNA linear PLN 17-MAY-2008
 DEFINITION Clavispora lusitaniae 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU663568
 VERSION EU663568.1 GI:187940505
 KEYWORDS .
 SOURCE Clavispora lusitaniae
 ORGANISM Clavispora lusitaniae
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; Metschnikowiaceae; Clavispora.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 256)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of Candida species in blood clinical samples by
 restriction fragment length polymorphism of polymerase chain
 reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 256)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-APR-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..256
 /organism="Clavispora lusitaniae"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="blood"
 /db_xref="taxon:36911"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano, G."
 misc_RNA <1..>256
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaattgcgat acgtagtatg acttgcagac gtgaatcatc
 61 gaatctttga acgcacattg cgcctcgagg cattcctcga ggcattgcctg ttgagcgtc
 121 gcatccccctc taacccccgg ttaggcgttg ctccgaaata tcaaccgcgc tgtaaacac
 181 gtttacagca cgacatttcg ccctcaaatc aggtaggact acccgctgaa cttaagcata
 241 tcaataagcg gaggaa
 //

LOCUS EU663567 347 bp DNA linear PLN 17-MAY-2008
 DEFINITION *Issatchenkia orientalis* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU663567
 VERSION EU663567.1 GI:187940504
 KEYWORDS .
 SOURCE *Pichia kudriavzevii* (anamorph: *Candida krusei*)
 ORGANISM *Pichia kudriavzevii*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; *Pichia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 347)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of *Candida* species in blood clinical samples by restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 347)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-APR-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..347
 /organism="*Pichia kudriavzevii*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="blood"
 /db_xref="taxon:4909"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano, G."
 misc_RNA
 <1..>347
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat acctagtgtg aattgcagcc atcgtgatca
 61 tcgagttctt gaacgcacat tgcgcccctc ggcattccgg ggggcatgcc tgtttgagcg
 121 tcgtttccat cttgcgcgtg cgcagagtgt ggggagcgga gcggacgacg tgtaaagagc
 181 gtcggagctg cgactcgctt gaaagggagc gaagctggcc gagcgaacta gacttttttt
 241 cagggagcct tggcggccga gagcgagtgt tgcgagacaa caaaaagctc gacctcaaat
 301 caggtaggaa taccgcgtga acttaagcat atcaataagc ggaggaa
 //

LOCUS EU663566 379 bp DNA linear PLN 17-MAY-2008
 DEFINITION *Pichia guilliermondii* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU663566
 VERSION EU663566.1 GI:187940503
 KEYWORDS .
 SOURCE *Pichia guilliermondii* (anamorph: *Candida guilliermondii*)
 ORGANISM *Pichia guilliermondii*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; *Pichia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 379)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of *Candida* species in blood clinical samples by restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 379)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G., Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C. and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-APR-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..379
 /organism="*Pichia guilliermondii*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="blood"
 /db_xref="taxon:4929"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano, G."
 /note="anamorph: *Candida guilliermondii*"
 misc_RNA
 <1..>379
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat aagtaatatg aattgcagat ttctcgtgatc
 61 atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgccctc tggtattcca gagggcatgc ctgtttgagc
 121 gtcattttctc tctcaaacc cggggtttgg tattgagtga tactcttagt cggactaggc
 181 gtttgcttga aaagtattgg catgggtagt actagatagt gctgtcgacc tctcaatgta
 241 ttaggtttat ccaactcgtt gaatgggtgtg gcgggatatt tctggtattg ttggcccggc
 301 cttacaacaa ccaacaagt ttgacctcaa atcaggtagg aatacccgt gaacttaagc
 361 atatcaataa gcggaggaa
 //

LOCUS EU663565 337 bp DNA linear PLN 17-MAY-2008
 DEFINITION *Candida albicans* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU663565
 VERSION EU663565.1 GI:187940502
 KEYWORDS .
 SOURCE *Candida albicans*
 ORGANISM *Candida albicans*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 337)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Identification of *Candida* species in blood clinical samples by
 restriction fragment length polymorphism of polymerase chain
 reaction products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 337)
 AUTHORS Ramos-Alfano,G., Gonzalez-Gonzalez,G., Rivera-Morales,L.G.,
 Arechiga-Carvajal,E.T., Alcocer-Gonzalez,J.M., Rodriguez-Padilla,C.
 and Adame-Rodriguez,J.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (21-APR-2008) Microbiologia e Inmunologia, Universidad
 Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San
 Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..337
 /organism="*Candida albicans*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolation_source="blood"
 /db_xref="taxon:5476"
 /country="Mexico"
 /identified_by="Ramos-Alfano, G."
 misc_RNA <1..>337
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
 spacer 2, and 28S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcatcgatga gaacgcagcg aaatgcgata cgtaatatga attgcagata ttcgtgatca
 61 tcgaatcttt gaacgcacat tgcgccctct ggtattccgg agggcatgcc tgtttgagcg
 121 tcgtttctcc ctcaaaccgc tgggttttgt gttgagcaat acgacttggg tttgcttgaa
 181 agacggtagt ggtaaggcgg gatcgctttg acaatggcct aggtctaacc aaaaacattg
 241 cttgcggcgg taacgtccac cacgtatatc ttcaaacttt gacctcaat caagtaggac
 301 taccgcgtga acttaagcat atcaataagc ggaggaa
 //

LITERATURA CITADA

Ali R, Ozkalemkas F, Ozcelik T, Ozkocaman V, Bayram S, Ener B, Ursavas A, Ozal G, Tunalı A. 2006. Invasive pulmonary aspergillosis: role of early diagnosis and surgical treatment in patients with acute leukemia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 5:17.

Ayatollahi Mousavi S A, Salari S, Rezaie S, Shahabi Nejad N, Sanaz Hadizadeh H, Kamyabi H, Aghasi H. 2012. Identification of *Candida* Species Isolated From Oral Colonization in Iranian HIV-Positive Patients, by PCR-RFLP Method. *Jundishapur J Microbiol*. 5:336-340.

Bagg J, Sweeney MP, Lewis MAO, Jackson MS, Coleman D, Al Mosaid A. 2003. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliative Medicine*. 17:477-481.

Baley JE, Kliegman RM, Fanaroff AA. 1984. Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. *Pediatrics*. 73:144-152.

Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, vanLeeuwen W, vanBelkum A, Bretagne S, Latge JP. 2001. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol*. 39:2683-2686.

Barnes AJ, Denning DW. 1993. Aspergillii-significance as pathogens. *Rev Med Microbiol*. 4:176-180.

Beck-Sague C, Jarvis WR. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis*. 167:1247-1251.

Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. 1990. Detection of surgical pathogens by *in vitro* DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery*. 108:338-347.

Burger G, Strauss J, Scazzocchio C, Lang BF. 1991. NirA, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol Cell Biol*. 11:5746-5755.

Casanova CL, Ruiz OI. 1993. *Histoplasma capsulatum* en sangre periferica de pacientes con SIDA: Informe de cuatro casos con elevación de deshidrogenasa láctica. Rev Invest Clin. 45:67-70.

Cahill BC, Hibbs JR, Savik K. 1997. Aspergillus airway colonization and invasive disease after lung transplantation. CHEST. 112:1160-1164 .

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulain-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol. 38:2302-2310.

Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. Med Mycol. 36:156-165.

DeLone DR, Goldstein RA, Petermann G. 1999. Disseminated aspergillosis involving the brain: distribution and imaging characteristics. Am J Neuroradiol. 20:1597-1604.

Del Palacio A., Cuétara MS, Pontón J. 2003. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev Iberoam Micol. 20: 90-98.

Denning DW. 1996. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 23:608-615.

Diz P, Ocampo A, Otero I, Iglesias I, Martinez C. 2001. Changes in oropharyngeal colonization and infection by *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis. 183:355-356.

Duerr A, Sierra M, Clarke L. 1993. Vaginal candidiasis among HIV-infected women. In: Proceedings of the IXth International Conference on AIDS, Berlin, Vol I, Abstract No. PO-B01-0880: 282.

Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller C, Bowden R, Van Burik JA, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. Journal of Clinical Microbiology. 35:1353-1360.

Ellis CA, Spivack ML. 1967. The significance of candidemia. Ann Intern Med. 67:511-522.

Esandi ME, Diaz E, Rello J. 1999. Significado de los aislamientos de *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* en muestras obtenidas con fibrobroncoscopio de pacientes no neutropenicos con infiltrados pulmonares. Rev Iberoam Micol. 16:1-3.

Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol.* 39:2873-2879.

Flores KM, White CS, Wisniewski P. 1994. Invasive pulmonary aspergillosis: CT diagnosis of a peribronchial sinus track in an AIDS patient. *J Comput Assist Tomogr.* 18: 495-496.

Flückiger U, Marchetti O, Bille J, Eggimann P, Zimmerli S, Imhoff A. 2006. Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med Wkly.* 136:447-463.

Fridkin SK, Jarvis WR. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 9:499-511.

Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J Clin Microbiol.* 39:3617–3622.

García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J. 2004. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficentes. *Rev Iberoam Micol.* 21:55-62.

Gaziano R, Bozza S, Bellochio S. 2004. Anti-*Aspergillus fumigatus* Efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48:4414-4421.

Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41:95-98.

Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P. 2006. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol.* 132:478-486.

Hee HW. 1997. Differences in public and private health services in a rural district of Malaysia. *Med J Malaysia.* 52:296-298.

Heinic GS, Stevens DA, Greenspan D, MacPhail LA, Dodd CL, Stringari S, Strull WM, Hollander H. 1993. Fluconazole-resistant *Candida* in AIDS patients. Report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 76:711-715.

Henry T, Iwen P, Hinrichs S. 2000. Identification of *Aspergillus* species using Internal Transcribed Spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology.* 38:1510-1515.

Hernández-Hernández, F, Cordoba-Martinez, E, Manzano-Galoso, P, López-Alvarez, R, Bazán-Mora, E, López-Martínez, R. 2003. Frecuencia de micosis en

pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de Mexico. Salud Pública Mex. 45:455-60.

Hinrikson HP, Hurst SF, De Aguirre L, Morrison CJ. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. Med Mycol. 43:129-137.

Hunter KD. 1998. Fluconazole-resistant candida species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 85:558-564.

Inoue H, Kimura T, Makabe O, Takahashi K. 1991. The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* proteinase A. J Biol Chem. 266:19484-19489.

Iwen PC, Rupp ME, Bishop MR. 1998. Disseminated aspergillosis caused by *Aspergillus ustus* in a patient following allogeneic peripheral stem cell transplantation. J Clin Microbiol. 36:3713-3717.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1987. Review of Medical Microbiology, 17 th ed. Norwalk: Appleton and Lange. pp. 318-337

Jin J, Lee YK, Wickes BL. 2004. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. 42:4293-4296.

Kanbe T, Arishima T, Horii T, Kikuchi A. 2003. Improvements of PCR-based identification targeting the DNA topoisomerase II gene to determine major species of the opportunistic fungi *Candida* and *Aspergillus fumigatus*. Microbiol. Immunol. 47: 631-638.

Kappe R, Muller J. 1991. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. J Clin Microbiol. 29:1665-1669.

Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J. 2000. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. Clin Infect Dis. 31:188-189.

Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. 2004. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 170:22-48.

Lasker BA. 2002. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigates* isolates. J Clin Microbiol. 40:2886-2892.

Markin RS, Stratta RJ, Woods GL. 1990. Infection after liver transplantation. Am J Surg Pathol. 14:64-78.

Martinez CA. 1998. Tratamiento de las micosis profundas: estado actual. *Acta Medica*. 8:69-77.

Martsinkovskaya, AI, Moukhamedov RS, Abdugarimov AA. 1996. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences for differentiation of varieties and species of *Gossypium* cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*. 14:44-49.

Mendez-Tovar LJ, Lopez-Martinez R, Macotella-Ruiz E, Manzano-Gayosso P, Serrano-Jaen L, Carmona-Castañón A. 1999. Variación en la frecuencia de micosis en México. *Rev Argen Microbiol*. 31:107-113.

Miller WT, Sais GJ, Frank I. 1994. Pulmonary aspergillosis in patients with AIDS. Clinical and radiographic correlations. *Chest*. 105:37-44.

Moore CB, Law D and Denning DW. 1993. In-vitro activity of the new triazole D0870 compared with amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother*. 32:831-836.

Moukhamedov R, Hu X, Nazar RN, Robb J. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology*. 84:256-259.

Nazar RN, Hu X, Schmide J, Gelham D, Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 39:1-11.

Nucci M, Spector N, Bueno AP, Solza C, Perecmanis T, Bacha PC. 1997. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 24:575-579.

Oakley KL, Moore CB, Denning DW. 1997. In vitro activity of SCH-56592 and comparison with activities of amphotericin B and itraconazole against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 41:1124-1126.

Odds FC. *Candida and Candidosis*. London, Bailliere Tindall (eds), 1988, p117.

Pagano L, Caira M, Candoni A. 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 91:1068-1075.

Perfect JR, Cox GM, Lee JY. 2001. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 33:1824-1833.

Perry JL, Miller GR. 1987. Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 25:2424-2425.

Pfaller M. 1994. Epidemiology and control of fungal infections. Clin Infect Dis. 19:8-13.

Pfaller MA, Herwald L. 1997. The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance and new technology. Clin Infect Dis. 25:858-870.

Philips P, Weiner MH. 1987. Invasive aspergillosis diagnosed by immunohistochemistry and monoclonal and polyclonal reagents. Hum Pathol. 18:1015-1024.

Pinto P, Resende M, Koga-Ito C, Ferreira J, Tendler M. 2004. rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. Can. J. Microbiol. 50:514-520

Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. 2003. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. Diagnostic microbiology and infectious disease. 47:487-496.

Quindós G. 2002. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. Rev Iberoam Micol. 19:1-4.

Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, Vauras J, Nikoskelainen J, Viljanen MK, Salonen J. 2003. Semiquantitative detection by Real-Time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 41:4304-4311.

Rath P. 1998. Susceptibility of *Aspergillus* strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. J Antimicrob Chemother. 41:567-570.

Regezi J, Sciubba J. Patologia bucal. 2ed. México, Mc Graw-Hill 1995; pp 126-127.

Richardson MD, 1997 Warnock DW. Fungal infection: Diagnosis and Management. Blackwell Science.; pp. 113-130

Richardson MD, 2003 Warnock DW. Fungal infection: Diagnosis and Management. 3rd ed. Atlanta, GA: Blackwell publishing; pp. 156-182.

Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E, Tinteln K, Schwerdtfeger R, Presterl E. 2007. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. Clin Infect Dis. 44:1078-1083.

Rüchel R. 1996. Mycotic infections in the immunocompromised patient. Rev Iberoam Micol. 13:20-24.

Sambrook J and Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd Ed. Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, pp. 6-32.

Sandhu G, Kline B, Stockman L, Roberts G. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:2913-2919.

Schimmelpfennig C, Naumann R, Zuberbier T. 2001. Skin involvement as the first manifestation of systemic aspergillosis in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 27:753-755.

Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. 2003. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 41:5660-5664.

Senté JM. 1997. Risk factors and physiopathology of Candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 14: 6-13.

Singh N, Paterson DL. 2005. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*. 18:44-69.

Sobel JD. 1992. Patogénesis ad treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis*. 14:148-53.

Slavin MA, Szer J, Grigg AP, Roberts AW, Seymour JF, Sasadeusz J. 2004. Guidelines for the use of antifungal agents in the treatment of invasive *Candida* and mould infections. *Intern Med J*. 34:192-200.

Staples CA, Young-Kang E, Wright JL. 1995. Invasive pulmonary aspergillosis in AIDS: radiographic, CT, and pathologic finding. *Radiology*. 196:409-416.

Sturtevant J, Calderone R. 1997. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol*. 14:90-97.

Sutton D, Sanche S, Revankar S, Fothergill A, Rinaldi M. 1999. *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol*. 37:2343-2345.

Torres-Rodríguez JM, Brunet MI. 1991. Aspergilosis sistémica. Monografía clínica en Enfermedades Infecciosas. *Micosis sistémicas*. Doyma. 9:59-69.

Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Gobel UB, Adam T. 2004. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Methods*. 56:201-211.

Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA and Kabani AM. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1846-1851.

Unzaga MJ, Gallego L, Berdonces P, Dones JR Cisterna R. 1997. Diagnosis of candidiosis by amplification of small subunit of 18S rRNA gene. *Rev Iberoam Micol*. 14:23-25.

Van Burik JA, Colven R, Spach DH. 1998. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 36: 3115-3121.

Van den Saffele JK, Boelaert JR. 1995. Zygomycosis in HIV-positive patients: A review of the literature. *Mycoses*. 39:77-84.

Vargas-Montiel IL, Vargas-Caminos N, Molero M, Urbina M, Urdaneta A. 1999. *Candida* in biological human samples. *Rev Invest Clin*. 40:245-255.

Von Eiff MN, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. 1995. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 62:341-347.

Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD. 1991. Detection of circulating enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 324:1026-1031.

Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock S. 1995. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:3216-3220.

Wahyuningsih R, Freisleben H, Sonntag H, Schnitzler P. 2000. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 38:3016-3021.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols*. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (ed.). Academic press, San Diego, CA. 315-322.

White PL, Shetty A, Barnes RA. 2003. Detection of seven *Candida* using the light-cycler system. *J Med Microbiol*. 52: 229-238.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP and Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*. 39:309-318.

Wong B, Brauer KL. 1988. Enantioselective measurement of fungal D-arabinitol in the sera of normal adults and patients with candidiasis. J Clin Microbiol. 26:1670-1674.

Yalinay M, Kalkanci A, Kustimur S. 2003. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98:1027-1032.

Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. Journal of Clinical Microbiology. 39:2261-2266.

Zijlstra C, Lever MEA, Uenk JB, Silfhout VHC. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Genetics. 85:1231-1237.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Gerardo Ramos Alfano

**Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología**

**Tesis: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Candida* *Aspergillus*
MEDIANTE LA APLICACIÓN
DE LA PCR/RFLP.**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales:

Nacido en la ciudad de Monterrey; Nuevo León el 30 de Septiembre de 1977,
hijo de Héctor Arnoldo Ramos Gutiérrez y Aída Alfano Guerra.

Educación:

- Licenciatura de Biólogo (2000), Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
- Maestro en Ciencias con especialidad en Inmunobiología en 2004.
-

Experiencia Profesional:

Maestro de Tiempo Completo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Subdirector de la Dirección de Vinculación y Servicio Social de 2004-Julio del 2009, responsable directo de un proyecto de investigación PAICYT, director de tres tesis de licenciatura, autor de un capítulo de libro, ha participado en más de 20 congresos nacionales e internacionales. Autor de 4 artículos publicados en revistas nacionales e internacionales y 2 artículos de divulgación. Es Co-autor de 28 secuencias depositadas en el banco de genes internacional: VIH subtipo C: No. de acceso: DQ452132 (2006), 6 secuencias de VIH región V3: EU408334-EU408339 (2008), 8 secuencias de VIH región C2-V3: EU416194- EU416198 Y EU428951- EU428953 (2008), 6 secuencias de *Candida* y 5 de *Aspergillus*: EU663565-EU663569 y EU796734- EU796739 (2008)y 2 secuencias de VIH región V3: FJ613324_ FJ613325 (2009).